



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

Estudio *in vitro* del efecto de ácidos fenólicos naturales
sobre el crecimiento de mohos y la producción de
aflatoxinas.

Autor/es

Agostina Rodríguez Larrosa

Director/es

Agustín Ariño Moneva.
Juan José Carramiñana Esteban.

Facultad de Veterinaria
2014

Agradecimientos.

El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto I+D+i AGL2011/26808 “Prevención y reducción de toxinas de Fusarium en cereales mediante el uso de ácidos fenólicos naturales” del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España, así como por el Grupo de Investigación Consolidado A01 “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria” del Gobierno de Aragón y el Fondo Social Europeo.

En primer lugar dar las gracias a mis tutores el Dr. Agustín Ariño Moneva y el Dr. Juan José Carramiñana por la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y por la confianza depositada.

También agradecer la Dra. Susana Loran por su tiempo y dedicación, así como a mi compañera Noemí Bervis.

A mis padres, a Sabrina y a Daniel, gracias familia...

Índice General:

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. Justificación.....	3
3. Objetivos.....	5
4. Revisión bibliográfica.....	6
4.1. Micotoxinas y aflatoxinas.....	6
4.2. Efectos toxicológicos de las aflatoxinas.....	7
4.3. Mohos productores de aflatoxinas: factores que influyen en su desarrollo y en la producción de toxinas.....	8
4.4. Incidencia en alimentos.....	10
4.5. Ácidos fenólicos.....	12
5. Material y Métodos.....	13
5.1. Estudio <i>in vitro</i> del efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento y la producción de toxinas de <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2682 en medio líquido Yeast extract sucrose broth (YES).....	13
5.1.1. Obtención de la cepa de referencia.....	14
5.1.2. Preparación de la cepa.....	14
5.1.3. Preparación de la suspensión de esporos.....	15
5.1.3.1. Recuento en cámara de Neubauer.....	15
5.1.3.2. Confirmación por recuento en placa.....	16
5.1.4. Ácidos fenólicos.....	16
5.1.4.1. Preparación de las soluciones madres de ácidos fenólicos.....	17
5.1.5. Preparación del medio con ácidos fenólicos e inoculación de la cepa de <i>Aspergillus parasiticus</i>	18
5.1.6. Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de <i>Aspergillus parasiticus</i>	19
5.1.7. Efecto de los ácidos fenólicos sobre la producción de micotoxinas.....	20

5.2. Optimización de un método analítico para la determinación de aflatoxinas.....	23
5.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.....	23
5.2.1.1. Tiempos de retención.....	23
5.2.1.2. Longitud de onda de excitación y emisión.....	24
5.2.1.3. Composición de la fase móvil y flujo.....	24
5.2.2. Purificación: columnas de adsorción.....	25
5.3. Validación.....	25
5.3.1. Especificidad.....	25
5.3.2. Linealidad.....	26
5.3.3. Sensibilidad.....	26
5.3.3.1. Límite de detección (LD).....	26
5.3.3.2. límite de cuantificación (LC).....	26
5.3.4. Exactitud (Recuperación).....	27
5.3.5. Precisión.....	27
5.3.5.1. Precisión de la inyección.....	27
5.3.5.2. Repetibilidad del método.....	28
5.3.5.3. Reproducibilidad del método.....	28
6. Resultados y discusión.....	29
6.1. Optimización del método analítico.....	29
6.1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.....	29
6.1.1.1. Tiempos de retención.....	29
6.1.1.2. Longitud de onda de excitación y emisión.....	30
6.1.1.3. Composición de la fase móvil y flujo.....	31
6.1.2. Purificación: columnas de adsorción.....	33
6.2. Validación.....	34
6.2.1. Especificidad.....	34
6.2.2. Linealidad.....	36
6.2.3. Sensibilidad.....	37
6.2.3.1. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	37
6.2.4. Exactitud (Recuperación).....	38
6.2.5. Precisión.....	38
6.2.5.1. Precisión de la inyección.....	38
6.2.5.2. Repetibilidad y reproducibilidad del método.....	39

6.3. Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CECT 2682.....	40
6.4. Efecto combinado de los ácidos fenólicos y el crecimiento del moho sobre el pH del medio YES	42
6.5. Efecto de los ácidos fenólicos sobre la biosíntesis de aflatoxinas, producidas por la cepa de <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2682.....	43
7. Conclusiones.....	48
8. Bibliografía.....	49
9. Anexos	

Índice de figuras.

Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas.....	6
Figura 2. Género <i>Aspergillus</i> . Colonias tipo de <i>A. flavus</i>	8
Figura 3. Estructura química de los ácidos fenólicos.....	12
Figura 4. <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2682. Colonias en agar PDA.....	14
Figura 5. Aspecto de conidióforos y esporos al microscopio.....	15
Figura 6. Confirmación del recuento de esporos en placa.....	16
Figura 7. Esquema. Experimento <i>in vitro</i>	19
Figura 8. Peso del micelio seco.....	20
Figura 9. Esquema. Proceso de extracción y purificación de la muestra.....	22
Figura 10. Patrón de 10 ng/mL para G ₁ y B ₁ y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ . Tiempos de retención y áreas.....	29
Figura 11. Cromatograma a 435 nm de emisión, patrón de 10 ng/mL para G ₁ y B ₁ y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂	30
Figura 12. Cromatograma a 420 nm de emisión, patrón de 10 ng/mL para G ₁ y B ₁ y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂	31
Figura 13. Cromatograma a 365 nm de ex. y de 435 nm de em. de patrón de 10 ng/mL para G ₁ y B ₁ y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ con fase móvil agua/acetonitrilo/metanol (60:15:30)	32
Figura 14. Cromatograma a 365 nm de ex. y 435 nm de em. de patrón de 10 ng/mL para G ₁ y B ₁ y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ con fase móvil agua/acetonitrilo/metanol (28,1:10,5:61,4)	32
Figura 15. Cromatograma de una muestra de maíz fortificado en 10 ng/mL para G ₁ y B ₁ y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ , purificada con la columna Mycosep® AflaZON 224.....	33
Figura 16. Cromatograma de una muestra de maíz fortificado con 10 ng/mL para G ₁ y B ₁ y 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ , purificada con la columna Isolute® Myco.....	34

Figura 17. Cromatograma a 365 nm de ex. y 435 nm de em. de un patrón de 10ng/ml para G ₁ y B ₁ y 3 ng/mL para B ₂ y G ₂ , fase móvil agua/acetonitrilo/metanol (40:10:50).....	35
Figura 18. Cromatograma de blanco de proceso.....	35
Figura 19. Cromatograma de una muestra de medio líquido YES, libre de aflatoxinas.....	35
Figura 20. Rectas de calibrado con concentraciones de 0,5 ng/mL a 10 ng/mL para B ₁ y G ₁ y de 0,15 ng/mL a 3 ng/mL para B ₂ y G ₂	36
Figura 21. Efecto de las concentraciones de ácidos fenólicos sobre el crecimiento de <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2682, en medio de cultivo líquido YES.....	40
Figura 22. Evolución del pH en 21 días de experimento, a distintas concentraciones de ácidos fenólicos.....	42
Figura 23. Producción de aflatoxinas totales (suma de B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂).....	44

Índice de tablas.

Tabla 1. Ácidos fenólicos: fórmula empírica, grado de pureza y peso molecular.....	17
Tabla 2. Preparación de las soluciones madre de ácidos fenólicos.....	17
Tabla 3 Suplementación del medio de cultivo líquido YES, con ácidos fenólicos.....	18
Tabla 4. Composición de la fase móvil.....	24
Tabla 5. Tiempos de retención. Desviación estándar y coeficiente de variación.....	29
Tabla 6. Estudio de la linealidad, rectas de calibración.....	36
Tabla 7. Límites de detección y límites de cuantificación.....	37
Tabla 8. LD y LC obtenidos por otros autores.....	37
Tabla 9. Porcentajes de recuperación para cada aflatoxina.....	38
Tabla 10. Precisión en la inyección. Desviación estándar relativa de cada aflatoxina.....	38
Tabla 11. Repetibilidad y reproducibilidad del método, coeficientes de variación.....	39

1. Resumen:

La calidad de las materias primas y la seguridad de los consumidores se ven amenazadas por diversas especies de mohos toxigénicos como es el caso del género *Aspergillus*. Estos mohos afectan a diversas especies de cereales y su incidencia está en aumento debido a los efectos del cambio climático.

Las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, son las principales responsables de la producción de aflatoxinas, metabolitos secundarios clasificados por la IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer) en el Grupo 1 como agentes cancerígenos para los humanos.

Estas micotoxinas han sido detectadas en cereales, productos derivados de cereales, cacahuets, oleaginosas, frutas desecadas, frutos secos, especias y leche.

Las estrategias para el control de la contaminación por las aflatoxinas antes de la cosecha son de gran interés práctico, dado que las pérdidas económicas directas e indirectas debidas a la contaminación por estas toxinas pueden afectar gravemente a la rentabilidad de los productores, sobre todo en el caso del maíz.

Existen diversas estrategias para prevenir y reducir la infección fúngica en estos cereales y la subsiguiente producción de micotoxinas. La necesidad de la agricultura para dar mayores rendimientos y ser más sostenible ha impulsado la investigación y el desarrollo de nuevos métodos y prácticas de control de plagas que no dependen de los plaguicidas químicos de síntesis, esto incluye la utilización de agentes antifúngicos naturales.

El objetivo general de este estudio es evaluar *in vitro* el efecto de los principales ácidos fenólicos naturales (ferúlico, cafeico, cumárico, clorogénico) a distintas concentraciones, sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* CECT 2682 y la capacidad de síntesis de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. Para ello se llevó a cabo la puesta a punto y la consiguiente validación de un método de detección por HPLC, cromatografía líquida de alta resolución, con una etapa previa de purificación mediante columnas de extracción en fase sólida.

Los ácidos fenólicos ensayados han mostrado un efecto fungistático frente a la cepa de *Aspergillus parasiticus* CECT 2682. La producción de aflatoxinas se vio inhibida en su totalidad a concentraciones de 20 mM. Los ácidos fenólicos que presentaron mayor efecto fueron el ácido clorogénico y el ácido cafeico.

Abstract:

The quality of raw materials and consumer safety are threatened by various species of toxigenic molds such as the genus *Aspergillus*. These molds affect various species of cereals and its incidence is increasing due to the effects of climate change.

Aspergillus flavus and *Aspergillus parasiticus*, are the main responsible species for the production of aflatoxins, secondary metabolites, classified by the IARC (International Agency for Research on Cancer) as Group 1 carcinogens to humans.

These mycotoxins have been detected in cereals, cereal products, groundnuts, oilseeds, dried fruits, nuts, spices and milk.

Strategies for the control of aflatoxins contamination before harvest are of great practical interest, since the direct and indirect economic losses due to aflatoxin contamination can seriously affect the profitability of producers, especially in the case of corn.

There are several strategies to prevent and reduce fungal infection in these grains and the subsequent production of mycotoxins. The need for agriculture to give higher yields and be more sustainable has driven research and development of new methods and practices of pest control that do not rely on synthetic chemical pesticides, this includes the use of natural antifungal agents.

The overall objective of this study is to evaluate in vitro the effect of major natural phenolic acids (ferulic, caffeic, coumaric, chlorogenic) at various concentrations on the growth of *Aspergillus parasiticus* CECT 2682 and its ability to synthesize aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. It was carried out the set-up and the subsequent validation of a method of detection by HPLC, high resolution liquid chromatography, with a prior step of purification by column solid phase extraction.

The phenolic acids tested showed a fungistatic effect against *Aspergillus parasiticus* CECT 2682. Aflatoxin production was inhibited at concentrations of 20 mM. The most effective phenolic acids were chlorogenic acid and caffeic acid.

2. Introducción:

2.1 Justificación:

El cambio climático es una realidad aceptada por la mayoría de los científicos. Temperaturas favorables y una humedad elevada son factores cruciales para el desarrollo de los mohos micotoxigénicos y la producción de micotoxinas. Asimismo, los escenarios del cambio climático en algunas zonas del mundo apuntan a períodos de fuerte sequía.

En general, si la temperatura aumenta en climas fríos o templados, los países en cuestión pueden llegar a ser más susceptibles a la presencia de mohos productores de aflatoxinas y los países tropicales pueden llegar a ser demasiado inhóspitos para el crecimiento de estos mohos (Russell *et al*, 2010).

Dentro del número elevado de factores que intervienen en la contaminación por micotoxinas, el clima es el más importante. Por otra parte, el clima influye directamente en la susceptibilidad del hospedador. A modo de ejemplo, los pistachos pueden desarrollar grietas en la cáscara bajo estrés por calor o sequía. También, la integridad de grano de maíz puede verse comprometida por divisiones laterales en el pericarpio del maíz que exponen a tejidos del núcleo a ataques por insectos o mohos (Cotty y Jaime-Garcia, 2007) todo ello conduce a una mayor contaminación por aflatoxinas. Además, el maíz es particularmente vulnerable a la influencia del clima como lo demuestra la experiencia con aflatoxicosis letales en Kenia (Lewis *et al.*, 2005).

En este contexto, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó en 2012 un informe basado en un modelo predictivo sobre la aparición de aflatoxinas en los cereales cultivados en la UE. El modelo A.Flavus-aflatoxina B₁, vinculado con la fenología del cultivo, se basó en los datos meteorológicos proporcionados por el JRC (Joint Research Centre of the EC), también designados como índices meteorológicos de riesgo para la contaminación de aflatoxina B₁ en el maíz, trigo y arroz durante la cosecha a nivel europeo. Se plantearon tres escenarios hipotéticos de cambio climático con diferentes aumentos de las temperaturas medias anuales (es decir, el real, +2°C y +5°C) y se elaboró un mapa, teniendo en cuenta la temperatura y la variabilidad de las precipitaciones entre años. De acuerdo con los resultados de este estudio, se espera que el riesgo de contaminación por aflatoxinas en el maíz pueda aumentar, sobre todo en el escenario +2°C. En este escenario, se prevé un claro aumento en el riesgo de AF (aflatoxinas) en la zonas agrícolas europeos típicas, como en el centro y sur de España, el sur de Italia y en los Balcanes, incluida Turquía (EFSA, 2012)

Por otro lado, debido al considerable interés de la industria alimentaria y la preocupación del consumidor por adquirir productos sanos y seguros, es necesario investigar alternativas al uso de compuestos sintéticos para combatir la infección por estos mohos (Nesci *et al.*, 2007). Por este motivo, en este trabajo se ha estudiado el efecto de los compuestos fenólicos, como alternativa a la utilización de compuestos químicos sintéticos para el control de mohos micotoxigénicos.

Los compuestos fenólicos además de presentar beneficios para la salud en determinadas patologías por su actividad antioxidante, poseen una actividad antimicrobiana demostrada. (Zabka y Pavela, 2013).

Existe evidencia a cerca de la capacidad de estos compuestos para inhibir la producción de varias micotoxinas de *Fusarium*, como fumonisinas y tricotecenos (Passone y Etcheverry, 2005; Palumbo y O’Keeffe, 2007; Ferrochio *et al.*, 2013).

Otros trabajos, han estudiado el efecto de aceites esenciales naturales para inhibir la producción de aflatoxinas en alimentos (Atanda *et al.*, 2007), pero los agentes antifúngicos ideales además de ser capaces de inhibir el crecimiento del moho y la producción de micotoxinas, deben hacerlo a niveles que no alteren la aceptabilidad sensorial y características organolépticas del producto tratado. (Samapundo *et al.*, 2007).

3. Objetivos:

Por todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Desarrollo y puesta a punto de un método de análisis de aflatoxinas, en muestras de medio de cultivo líquido contaminado *in vitro*, basado en la purificación por columnas de adsorción y determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Validación del método analítico desarrollado teniendo en cuenta las recomendaciones internacionales sobre el análisis de micotoxinas.
- Evaluación *in vitro* del efecto de los ácidos fenólicos (clorogénico, cafeico, p-cumárico, ferúlico) sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂) por la cepa *Aspergillus parasiticus* CECT 2682.

4. Revisión bibliográfica:

4.1 . Micotoxinas y aflatoxinas

Definir el término micotoxina de forma precisa y concreta no resulta sencillo. Como características generales se pueden mencionar que son productos naturales de bajo peso molecular, producidos como metabolitos secundarios por algunos mohos filamentosos (toxigénicos). Estos metabolitos poseen una estructura química y actividad toxicológica muy variada, y se agrupan principalmente porque pueden causar enfermedad o muerte en seres humanos y animales. Se las considera metabolitos secundarios porque son el producto de procesos metabólicos primarios y no intervienen en el crecimiento del moho, sus funciones no están claramente establecidas pero se cree que desempeñan un papel en la eliminación de otros microorganismos que compiten en el mismo entorno (Soriano Del Castillo, 2007).

El grupo de micotoxinas que competen a este trabajo, representadas en la figura 1, son las producidas principalmente por cepas de *Aspergillus flavus*, y *A. parasiticus*. El nombre aflatoxinas hace referencia al hecho de ser biosintetizadas por *Aspergillus flavus*, y fue propuesto en 1962 por sus descubridores. Las aflatoxinas están estructuralmente relacionadas, químicamente son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona, comunes a todas ellas. Todas ellas son muy fluorescentes, habiéndose aprovechado esta propiedad como base para su detección en los procedimientos analíticos. Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350, y la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos

moderadamente polares, tales como el cloroformo o el metanol. Actualmente se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales sólo seis tienen significación como contaminantes de los alimentos: las aflatoxinas del grupo B (B₁ y B₂), G (G₁ y G₂) y M (M₁ y M₂). En cuanto a las aflatoxinas B y G, se denominan así por el color de fluorescencia que emiten bajo luz UV; azul y verde, respectivamente. Y en cuanto a la numeración 1 y 2 dentro de cada grupo, hace referencia a su movilidad cromatográfica relativa (Soriano, 2007). No todas las cepas de *A. flavus* producen

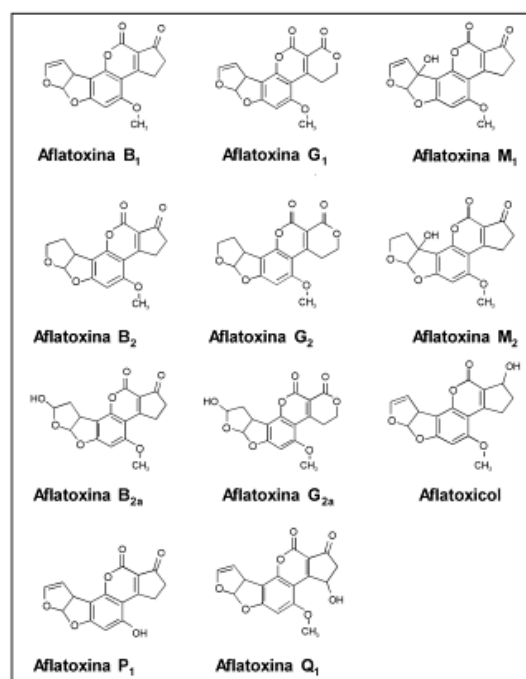


Figura 8.1. Figuras de algunas aflatoxinas.

Figura 1. (Soriano, 2007) pág. 169.

aflatoxinas y las que lo hacen, por lo general, sólo producen aflatoxinas del grupo B, mientras que casi todas las cepas de *A. parasiticus* producen toxinas del grupo B y G. (Klich, 2007)

Por otra parte, la aflatoxina M₁, un metabolito hidroxilado, se encuentra principalmente en los tejidos y fluidos animales (leche y orina) como un producto metabólico de la aflatoxina B₁. La aflatoxina M₁ no es un contaminante de los cereales forrajeros.

4.2. Efectos toxicológicos de las aflatoxinas:

Como acabamos de citar, las aflatoxinas más relevantes en términos de seguridad alimentaria son las aflatoxinas B₁ y B₂ (Producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*), G₁ y G₂ (producidas por *A. parasiticus*) y M₁ y M₂ (productos metabólicos de las aflatoxinas B₁ y B₂ que son excretados en leche). De entre todas ellas, destaca desde el punto de vista de la seguridad alimentaria la aflatoxina B₁, tanto por ser la más prevalente en alimentos como la más toxica para los seres humanos (AESAN, 2011).

Existe una fuerte evidencia de que la carcinogenicidad de las aflatoxinas funciona mediante un mecanismo de acción genotóxico que implica la activación de un metabolito epóxido, la formación de aductos de ADN, y la modificación del gen TP53. En el carcinoma hepatocelular humano de las zonas geográficas donde la exposición a las aflatoxinas es alta, se ha demostrado que hasta el 50% de los tumores albergan una mutación puntual específica en el gen supresor de tumores TP53. Las aflatoxinas son compuestos cancerígenos para los humanos (Grupo 1) (IARC, A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations, 2012).

Las aflatoxinas, además tienen propiedades inmunosupresoras, que pueden favorecer infecciones en las personas afectadas por estas sustancias. Contribuyen significativamente a aumentar el riesgo de cáncer de hígado en personas con infección crónica por hepatitis B (VHB) y se considera un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer hepatocelular en África y Asia. (Bezerra da Rocha, *et al.* 2014)

Los efectos biológicos producidos como respuesta al consumo de aflatoxinas, dependen de la variación entre especies, la edad, el sexo, el estado nutricional, los componentes de los alimentos en los que estén presentes y las interacciones con sustancias químicas. Adicionalmente, la dosis y el periodo de exposición del organismo a la toxina también son muy importantes. Las manifestaciones clínicas de la aflatoxicosis aguda son, vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, así como infiltración grasa y necrosis del hígado (Kensler *et al.*, 2011). No obstante, la aparición de estos

cuadros en seres humanos es sumamente escasa y su peligrosidad viene determinada básicamente por su toxicidad crónica. El potencial carcinogénico de las aflatoxinas, fundamentalmente de la aflatoxina B₁, ha sido bien establecido en muchas especies animales, incluyendo roedores (que tienen una alta susceptibilidad a estas sustancias), primates y peces. El hígado es el principal órgano afectado por la acción tóxica de la aflatoxina B₁. No obstante, dependiendo de la especie animal y la raza, la dosis, la vía de exposición y la dieta de los sujetos expuestos, también se han documentado tumores relacionados con la acción de las aflatoxinas en otros órganos y lugares del cuerpo tales como los riñones o el colon (Kensler *et al.*, 2011).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado las aflatoxinas B y G en varias ocasiones desde 1987 (JECFA, 1987, 1997, 1999, 2002, 2007) y ha recomendado que, debido a su potencial carcinogénico, la exposición dietética a las aflatoxinas se reduzca al mínimo posible. Igualmente, en 2007, el informe del Panel de Contaminantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria indicó que la exposición a las aflatoxinas procedentes de todas las fuentes alimentarias debía mantenerse tan baja como fuera razonablemente posible debido a sus propiedades genotóxicas y carcinogénicas (EFSA, 2009).

4.3. Mohos productores de aflatoxinas: factores que influyen en su desarrollo y en la producción de micotoxinas:

Las especies de este género son mayoritariamente ubicuas, aislándose en diferentes sustratos, aunque con mayor frecuencia de climas cálidos. Las colonias de las especies de este género se desarrollan de forma rápida y presentan diversas tonalidades: blanquecinas, amarillentas, marrones o verdosas, tal y como puede observarse en la figura 2. Generalmente las colonias están formadas por un micelio base del que se diferencian los conidióforos. En el género *Aspergillus* los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos casos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células soporte. Si las fiálides nacen directamente de la vesícula se denominan, *Aspergillus* uniseriados, si nacen a partir de las métulas, se denominan biseriados. Las vesículas, las fiálides y las métulas, si están presentes forman la cabeza conidial,

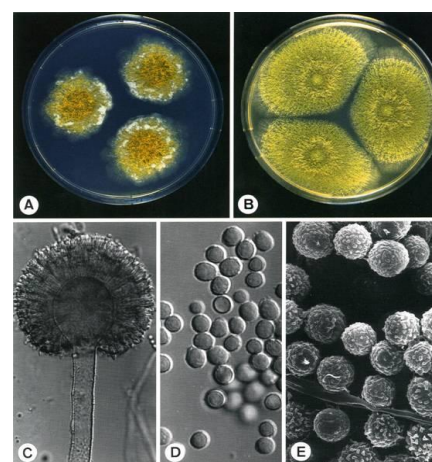


Figura 2, *Aspergillus flavus*. (A) Colonias CZ, 14 días a 25°C. (B) Colonias MEA, 14 días a 25°C. (C) *Aspergillum* X530. (D) Conidios X1820. (E) Conidios X8655.

juntamente con los conidios (Abarca, *et al.*, 1986). Basándose en características morfológicas y de cultivo, Raper y Fenell (1965) describieron 18 especies, que más tarde, se denominaron secciones y se agruparon en 6 subgéneros (Samson, *et al.*, 2004).

Las especies *A. parasiticus* y *A. flavus* pertenece a la sección *Flavi*. Son considerados hongos de campo, aunque la colonización y la consecuente contaminación por aflatoxinas pueden ocurrir durante el almacenamiento. En maíz se ha demostrado que, incluso bajo condiciones óptimas de almacenamiento, puede haber contaminación por aflatoxinas. (Saleemullah *et al.*, 2006)

La ubicuidad de estos mohos es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre sustratos con diverso contenido de humedad. Los factores implicados en el crecimiento de los mohos pertenecientes al género *Aspergillus* en los alimentos son tanto los propios del medio en el que se desarrollan (pH, composición del alimento o actividad de agua), como factores extrínsecos: humedad ambiental, temperatura de almacenamiento y competencia microbiana (Zinedine y Mañes, 2009). *A. flavus* y *A. parasiticus*, los principales mohos productores de aflatoxinas, tienen patrones similares de crecimiento y toxicogénesis.

Aunque las condiciones descritas varían ligeramente en función de la fuente bibliográfica, algunos autores refieren que *A. flavus* y *A. parasiticus* crecen en un intervalo de temperatura de 10 a 43° C, con una temperatura óptima, entre 32 y 33° C. Pueden crecer en un intervalo de pH amplio (2,1 a 11,2) con un crecimiento óptimo entre 3,5 y 8. En cuanto a la actividad de agua (*A_w*) los valores mínimos de crecimiento están entre 0,80 y 0,83 y el óptimo en 0,99. Por lo que se refiere a la toxicogénesis, el intervalo de temperatura en el que se producen las aflatoxinas va de 12 a 40° C, con un óptimo entre 25 y 30° C. En *A. parasiticus* la proporción de producción de aflatoxinas B respecto a G es mayor a temperaturas altas. Se producen en un intervalo de pH entre 3,5 y 8, con un óptimo de pH 6 y, en cuanto a la actividad del agua, el mínimo para la producción es de 0,82 para *A. flavus* con un óptimo de 0,99. El clima típico de los países mediterráneos, caracterizado por temperatura y humedad altas, favorece tanto el crecimiento de los mohos como la producción de aflatoxinas (óptimo entre 25 y 30° C) (AESAN, 2011).

La composición gaseosa ambiental en la que crece el moho y la luz, también pueden influir en el crecimiento del hongo y en la producción de aflatoxinas (Sanchis, *et al.*, 2004).

Otro factor importante, que influye en el desarrollo de estos mohos, es una humedad elevada. Las combinaciones de temperatura y humedad elevadas, por ejemplo, periodos de lluvia antes de la

cosecha de alimentos infectados por estos mohos, producen concentraciones inaceptables de aflatoxinas. (Russell, *et al.*, 2010)

Cuando el grano está en pleno desarrollo y hay temperaturas ambientales cálidas, con las condiciones de sequía, el grano se vuelve más susceptible a la formación de aflatoxinas. El organismo saprofito se difunde a través de sus conidios (esporas asexuales) llevados por el viento o los insectos a los cultivos en crecimiento. Cualquier condición que ofrezca un portal de entrada en el tejido de la planta hospedadora o elimine la integridad de la cubierta de la semilla permitirá al organismo entrar y crecer en el tejido vivo del huésped, incluyendo los núcleos del grano en desarrollo. Los insectos, como escarabajos y el taladro europeo del maíz pueden proporcionar transmisión y portales de entrada en la planta huésped. El maíz, los frutos secos y ciertas oleaginosas son los principales cultivos afectados. Granos almacenados con humedad por encima del 14%, a temperaturas cálidas ($>20^{\circ}\text{C}$) y / o insuficientemente secas son susceptibles de contaminación. Para poder evitarlo, los granos deben mantenerse secos, libres de daños y libres de insectos (Richard, 2007).

4.4. Incidencia en alimentos:

La contaminación por *Aspergillus* puede producirse en los propios cultivos, como sucede con los cacahuètes, los pistachos y el maíz, algunas veces favorecida por la acción de los insectos, o en el transporte y almacenamiento, como sucede con los cereales. La toxina puede persistir en el alimento aunque el moho toxigénico haya desaparecido y, en este sentido, se han detectado aflatoxinas en prácticamente todas las zonas del mundo y en casi todos los alimentos de primera necesidad, en mayor o menor medida. Además, resulta también un factor clave el hecho de que estas toxinas presentan una elevada estabilidad térmica, lo cual favorece que permanezcan en algunos alimentos cocinados y que la congelación no tenga apenas efectos sobre su presencia en los alimentos (Rasch *et al.*, 2010).

Los alimentos más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas y que pueden implicar una mayor exposición están incluidos en el Reglamento (CE) N° 1831/2003 (maíz, arroz, cereales en general, avellanas, almendras, nueces de Brasil, pistachos, cacahuètes y otras semillas oleaginosas, frutas secas como higos o pasas y especias como el pimentón, nuez moscada, jengibre, así como la leche). Para ellos se han establecido límites máximos.

En el año 2013, la EFSA elaboró un informe técnico sobre la presencia de aflatoxinas (suma de B₁, B₂, G₁ y G₂) en cereales y productos alimenticios derivados de cereales. El muestreo se llevó a cabo en 16 países europeos, siendo Alemania el país más representado, seguido de Austria y Eslovenia. En cuanto a “productos elaborados a base de cereales” se analizaron un total de 842 muestras, las tres categorías con mayor número de muestras analizadas fueron "Cereales para el desayuno", 346 muestras, "los alimentos a base de cereales para lactantes y niños pequeños", 253 muestras y "Productos de panadería fina" 101 muestras. Para los alimentos a base de cereales, como por ejemplo productos de pastelería se encontró un valor medio de 0,45 µg/kg y para pasta cruda el valor medio fue de 1,87 µg/kg. Los cereales para el desayuno mostraron valores promedio de 0,05 µg/kg y 0,46 µg/kg en el límite inferior y en el límite superior, respectivamente. Entre las muestras cuantificadas, dos muestras de cereales para el desayuno estaban por encima de los límites máximos especificados en la legislación (4 µg/kg). De las 51 muestras cuantificadas de cereales o productos transformados, siete mostraron valores superiores a 1 µg/kg de la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (EFSA, 2013).

Se ha descrito la presencia de aflatoxinas en otros productos alimenticios, incluyendo productos de origen animal, productos cárnicos procesados como los embutidos fermentados (Markov *et al.*, 2013). También se ha encontrado presencia de aflatoxinas en productos vegetales, hortalizas de hoja verde (Hariprasad *et al.*, 2013), café (Russell *et al.*, 2014). Además se ha comprobado la presencia de estas micotoxinas en bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza (Rasch *et al.*, 2010) o la leche (Zinedine *et al.*, 2007). En el caso de este último alimento la presencia de aflatoxinas B y G es mucho menos relevante que la presencia de la aflatoxina M₁, metabolito de la aflatoxina B₁ (Ayar *et al.*, 2007).

Las herramientas más importantes para prevenir y limitar la aparición de aflatoxinas en los alimentos son las buenas prácticas durante la producción agrícola y el almacenamiento de los alimentos, que deben realizarse a temperaturas y humedades relativas que dificulten tanto el crecimiento fúngico como la producción de aflatoxinas por parte de los hongos potencialmente productores de las mismas. Es también sumamente importante evitar la contaminación cruzada entre lotes diferentes de alimentos. Durante el procesado del alimento puede lograrse el objetivo de reducir la exposición alimentaria a las aflatoxinas mediante la selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios (AESAN, 2011).

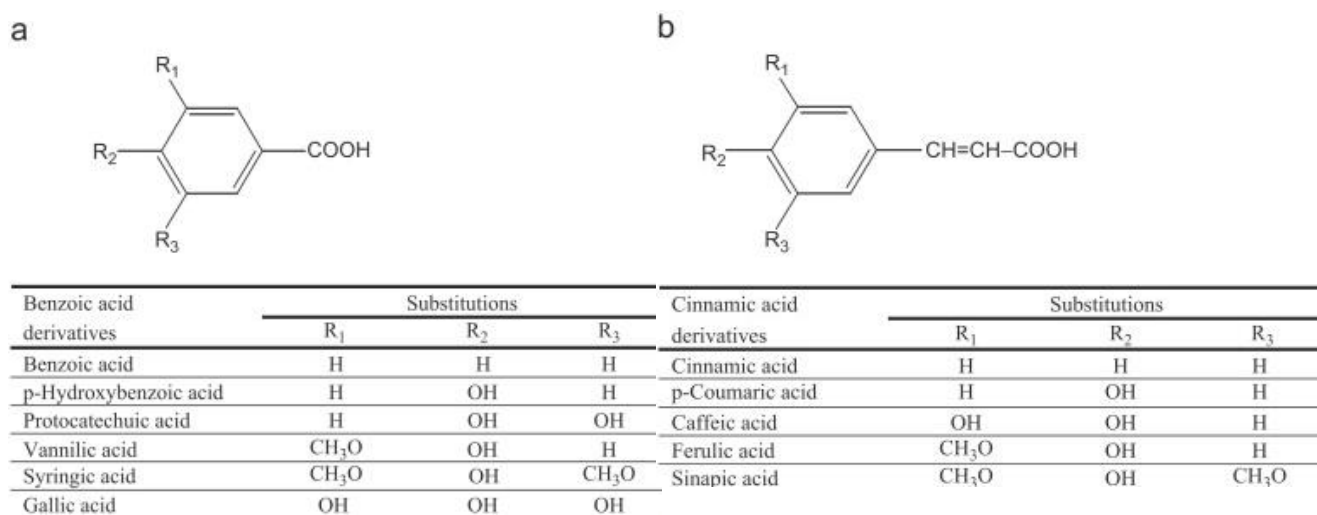


Figura 3. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos: (a) los derivados del ácido benzoico y (b) los derivados del ácido cinámico. (Liu, 2007).

4.5. Ácidos Fenólicos:

Debido al considerable interés de la industria alimentaria y preferencias del consumidor por encontrar nuevos métodos para garantizar la seguridad alimentaria, se realizan esfuerzos por investigar los efectos de los antioxidantes naturales, y así poder reducir la utilización de compuestos sintéticos (Nesci *et al.*, 2007).

Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario en plantas, y cumplen funciones esenciales en la reproducción y crecimiento de las plantas, actuando como mecanismos de defensa contra agentes patógenos, parásitos y depredadores, y contribuyen al color de las plantas. Además de sus funciones en las plantas, los compuestos fenólicos en nuestra dieta pueden proporcionar beneficios para la salud asociados con un menor riesgo de enfermedades crónicas (Liu *et al.*, 2008).

Los compuestos fenólicos poseen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo, y en general se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, y taninos. Los ácidos fenólicos se pueden subdividir en dos grupos principales, derivados del ácido hidroxibenzoico y derivados del ácido hidroxicinámico (figura 3). Los derivados del ácido hidroxibenzoico incluyen *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico vanílico, sirínico y ácido gálico, presentes en la forma ligada, son típicamente componentes de estructuras complejas tales como ligninas y taninos hidrolizables. Los derivados de ácido hidroxicinámico incluyen *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, y ácido sinápico, presentes en la forma unida, ligados a los componentes estructurales de la pared celular tales como la

celulosa, lignina, y proteínas a través de enlaces éster. El ácido ferúlico se produce principalmente en las semillas y las hojas de las plantas, conjugado covalentemente a mono-y disacáridos, polisacáridos de la pared celular vegetal, glicoproteínas, poliaminas, lignina, y biopolímeros de hidratos de carbono insolubles. El ácido clorogénico y curcumina también son derivados del ácido hidroxicinámico. El ácido clorogénico es un éster de ácido cafeico, mientras que la curcumina está formada por dos moléculas de ácido ferúlico (Liu, 2007).

El interés en estos compuestos radica en que además de presentar beneficios potenciales para la salud en determinadas patologías por su actividad antioxidante, está demostrada su capacidad antimicrobiana (Zabka y Pavela, 2013).

Además, existe evidencia acerca de la capacidad de los compuestos fenólicos para inhibir la producción de varias micotoxinas de *Fusarium* incluyendo las fumonisinas y tricotecenos. También existen estudios, donde la producción de aflatoxinas se ve inhibida por la utilización de aceites esenciales naturales (Passone y Etcheverry, 2005; Palumbo y O’Keeffe, 2007; Ferrochio *et al.*, 2013), pero estos en ocasiones, pueden alterar las propiedades organolépticas del producto.

Los agentes antifúngicos ideales deben ser capaces de inhibir completamente el crecimiento y la producción de micotoxinas en niveles que no alteren la aceptabilidad sensorial del producto tratado (Samapundo *et al.*, 2007).

5. Material y métodos.

5.1. Estudio *in vitro* del efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento y la producción de toxinas de *Aspergillus parasiticus* CECT 2682 en medio líquido Yeast extract sucrose broth (YES):

El estudio se basó en la siembra de una cepa de referencia de *Aspergillus parasiticus*, en medio de cultivo líquido YES, compuesto por extracto de levadura al 2% y sacarosa al 15% (Gandomi *et al.*, 2009; Sindhu, 2007), al que se le añadieron cuatro ácidos fenólicos (clorogénico, cafeico, *p*-cumárico y ferúlico) a cuatro concentraciones 1 mM, 5 mM, 10 mM y 20 mM (Ferrochio, 2013; Palumbo, 2007), así como su correspondiente control sin enriquecer. Se hizo el seguimiento durante 21 días a 25° C. Para determinar el grado de inhibición del crecimiento del organismo, se pesó el micelio seco, y la producción de aflatoxinas se determinó mediante el método analítico de HPLC optimizado que se describe posteriormente.

5.1.1. Obtención de la cepa de referencia:

La cepa de *Aspergillus parasiticus* utilizada en este trabajo se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 2682). Esta cepa coincide con la NRRL 3145 de la colección de cultivos tipo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Fue elegida por su capacidad para producir las cuatro aflatoxinas: B₁, B₂, G₁ y G₂.

5.1.2. Preparación de la cepa

Se añadió al vial con el cultivo liofilizado, un volumen de caldo Sabouraud hasta una rehidratación completa. A partir de esta suspensión, con pipeta pasteur de vidrio estéril, se pasó parte del liófilo a tres tubos de ensayo con 9 mL de caldo Sabouraud. Los tubos se incubaron durante 4 días a 25°C, para garantizar las condiciones óptimas de crecimiento, lo que se confirmó por la presencia de turbidez en los tres tubos.

Una vez revivificada la cepa, fue cultivada en agar patata dextrosa (PDA, Merck®), compuesto por polvo de patata, glucosa y agar. El medio preparado y esterilizado, se vertió en placas de Petri con un volumen entre 18-20 mL. Una vez solidificadas se realizó la siembra, en tres puntos equidistantes de la placa. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 7 días (figura 4).

A continuación, tras el periodo de incubación a partir del agar nutritivo PDA, se tomó con un asa estéril, parte de micelio del borde de la colonia, para ser almacenado en crioviales, con un 15% de glicerol y conservados a -80°C.



Figura 4. Vial de *Aspergillus parasiticus* CECT 2682. Aspecto de la colonia en agar PDA.

5.1.3. Preparación de una suspensión de esporos.

A partir de las placas de PDA, tras los siete días de incubación a 25°C, se cogió micelio del borde de la colonia con asa estéril, para ser sembrado superficialmente en estrías en agar inclinado PDA. Los tubos de agar inclinado se incubaron nuevamente durante 7 días a 25°C.

Tras los días de incubación, se añadieron de manera aséptica 10 mL de un agente humectante (Tween 80 al 0,01% en agua destilada) a cada tubo de PDA. Se frotó con asa de Drigalski estéril la superficie del agar, para favorecer la liberación de esporos y micelio de la superficie.

La suspensión obtenida, se filtró con embudo y gasa estéril (la gasa se colocó en 4-5 capas). El filtrado, con los esporos, se recogió en tubos de rosca estériles para ser almacenados a 4°C hasta su recuento en cámara de Neubauer.

5.1.3.1 Recuento de esporos en cámara de Neubauer:

La cámara de recuento de Neubauer (Optik Labor) está adaptada a un microscopio de contraste de fases (Leica) que permite el recuento de las conidias y calcular el número de esporos por mL de suspensión, sin adición de colorantes.

Con pipetas y puntas estériles se depositan 100 µL de la suspensión de esporos en el portaobjetos específico (cámara de Neubauer), se cubre con un cubreobjetos que se adhiere por tensión superficial y se observa al microscopio con el objetivo de 40 aumentos.

El proceso de recuento de esporos se realizó tres veces y se calculó el promedio del número de esporos por mL de suspensión.

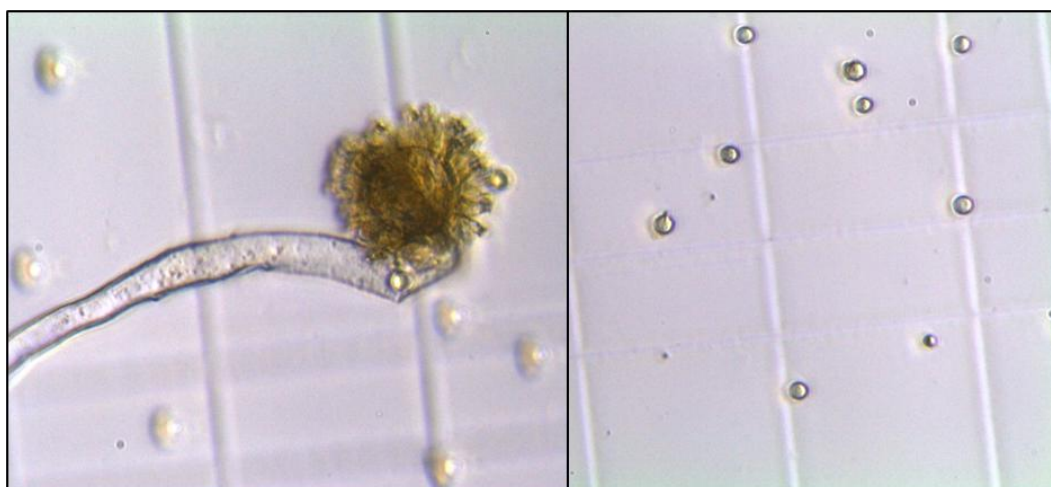


Figura 5. Foto propia. Aspecto del conidióforo y esporos al microscopio. Software Las Ez®.

5.1.3.2 Confirmación del recuento de esporos, mediante siembra en placa

Esta confirmación se realizó mediante siembra en superficie en agar PDA, por duplicado. Se prepararon diluciones decimales seriadas en tubos eppendorf estériles, cogiendo 0,1 mL de suspensión madre y llevandola a 0,9 mL de agua de peptona estéril al 0,1%, así hasta obtener la dilución que permita el recuento de esporos entre 10-100 esporos/mL en placa.

De las diluciones con recuentos teóricos entre los valores anteriores, se añadió 0,1 mL a una placa de agar PDA. Se sembró por extensión en superficie con asa de Drigalski. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 3 días.

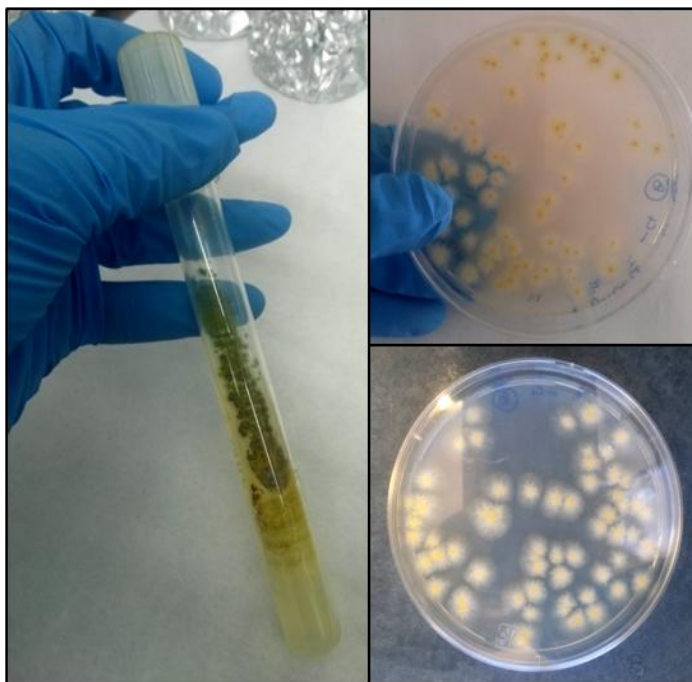


Figura 6. Agar PDA inclinado. Confirmación del recuento de esporos en Agar PDA.

Tras esta incubación, se contó el número de esporos de cada placa, sembradas por duplicado. Se hizo el promedio y se multiplicó por el inverso del volumen de la siembra y por el inverso del volumen de la dilución. El resultado se expresó en esporos/mL

Con el recuento en placa se confirma el recuento teórico obtenido en el cámara de Neubauer. Se persigue obtener una suspensión de esporos con un recuento aproximado de 10^6 esporos/mL. Esta solución se almacenó a 4° C hasta su uso.

5.1.4. Ácidos fenólicos:

Los ácidos fenólicos utilizados fueron: Clorogénico, Cafeico, *p*-Cumárico y Ferúlico. De la casa comercial Sigma-Aldrich Chemie (Tabla 1).

Ácido fenólico	Fórmula Empírica	Grado de Pureza	Peso molecular (gr/mol)
Clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	≥ 95%	354,31
Cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	≥ 98%	180,16
<i>p</i> -Cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	≥ 98%	164,16
Ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	99%	194,18

Tabla 1. Ácidos fenólicos utilizados en el estudio, fórmula empírica grado de pureza y peso molecular.

5.1.4.1 Preparación de las soluciones madre de ácidos fenólicos.

Se prepararon soluciones madre de los cuatro ácidos fenólicos a estudiar, clorogénico, *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, a concentraciones de 400 mM en etanol-agua en proporción 80:20. En la tabla 2 se muestra, a modo de resumen, la preparación de estas soluciones madres.

Los ácidos fenólicos se pesaron en un recipiente de cristal estéril con capacidad para 100 mL, protegidos de la luz.

Al añadir la proporción correspondiente de agua-etanol, el agua estéril debe ser añadida aproximadamente a 50°C para facilitar la solubilización del ácido.

Las soluciones madre fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta su uso.

Ácido fenólico	Pm (g/mol)	Peso (g)	Vol. Total (ml)	Etanol (%)	Vol. etanol (ml)	Vol. agua dest. (ml)	[mM.]	[ppm]
Clorogénico	354,31	7,086	50	80	40	10	400	141724
Ferúlico	194,18	3,883	50	80	40	10	400	77672
Cumárico	164,16	3,283	50	80	40	10	400	65664
Cafeico	180,16	3,603	50	80	40	10	400	72064

Tabla 2. Preparación de soluciones madre de ácidos fenólicos. Pm: peso molecular, [mM]: milimolar, [ppm]:o mg/L, partes por millón.

5.1.5 Preparación del medio con ácidos fenólicos e inoculación de la cepa de *Aspergillus parasiticus*:

Se preparó el medio de cultivo líquido YES; con extracto de levadura al 2%, sacarosa al 15% y agua destilada. Una vez autoclavado y enfriado, se ajustó el pH a 5,5 con una solución de ácido clorhídrico 1N, estéril.

En recipientes de vidrio, con 60 mL del medio de cultivo preparado, se añadió la solución madre del ácido fenólico correspondiente. Se suplementó el medio a cuatro concentraciones, 1 mM, 5 mM, 10 mM y 20 mM. Además de un recipiente sin suplementar, a modo de control. Este procedimiento está descrito en la tabla 3.

Concentraciones de ácidos a estudiar (mM)	Volumen a tomar de la solución madre (μL)	Volumen de medio de cultivo líquido YES (mL)
0	-	60
1	150	60
5	750	60
10	1500	60
20	3000	57

Tabla 3. Suplementación del medio líquido YES con distintas concentraciones de ácidos fenólicos.

Cada solución de medio de cultivo líquido enriquecida con ácido fenólico, se dispensó en tubos estériles. Se prepararon cuatro tubos de 9,9 mL, uno para cada concentración de ácido más un tubo control sin suplementar, para cada día de experimentación (día 4, 7, 10, 14 y 21) hasta un total de ochenta y cinco tubos. A cada uno, se le inoculó 0,1 mL de la suspensión de esporos (punto 5.1.3.) y se incubaron a 25 °C.

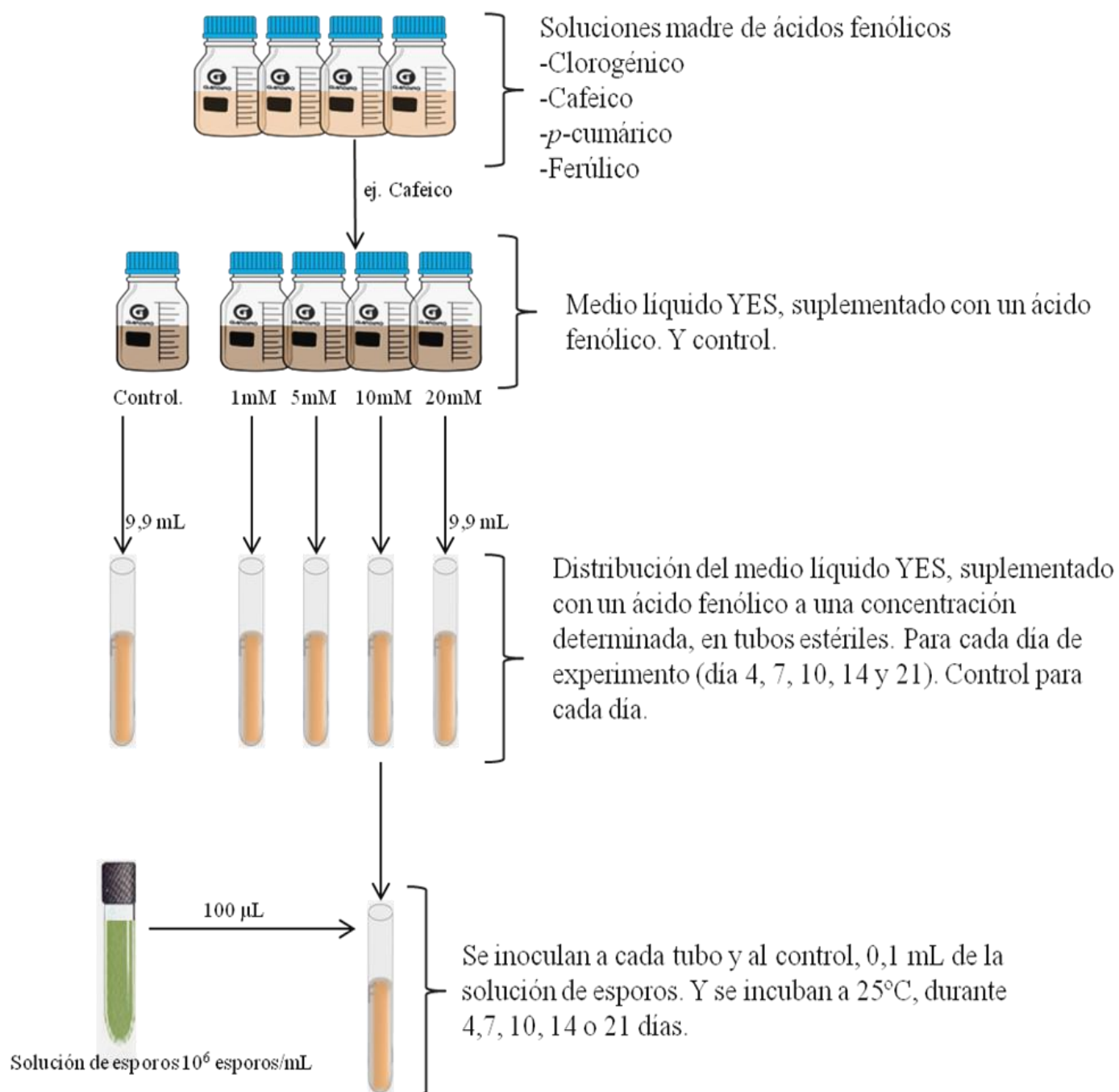


Figura 7. Esquema del experimento in vitro

5.1.6. Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus*:

En primer lugar, se pesó cada papel Whatman nº4 en balanza analítica, y se anotó el peso, para luego calcular el peso del micelio seco por diferencia.

Los tubos incubados con medio de cultivo líquido y micelio, fueron sometidos a un calentamiento rápido en el autoclave, a 121°C durante 3 minutos, para inactivar los esporos y el micelio vegetativo.

Se separó el micelio del medio de cultivo, filtrando el contenido del tubo con el papel de filtro Whatman nº4 previamente pesado (figura 8). El filtrado se recogió en tubos de ensayo, para el posterior análisis de las micotoxinas por HPLC, en esta etapa, además se midió el pH del medio. Se lavó el micelio con 10 mL de agua destilada, tres veces.

Se recogió el papel con el micelio y se llevó a estufa, para secar el micelio a 130°C durante 2 horas (Ariño y Bullerman, 1992). Transcurrido ese tiempo, se colocaron las muestras en un desecador durante 30 minutos y se pesaron en balanza analítica.

Para determinar el efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento del moho, se pesaron las muestras y se compararon con el control correspondiente al día de ensayo (micelio crecido en un tubo con medio de cultivo líquido YES, sin adición de ácidos fenólicos). Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento, respecto al control.



Figura 8. Evaluación del efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento del moho: Peso del micelio seco.

5.1.7. Efecto de los ácidos fenólicos sobre la biosíntesis de aflatoxinas, B₁, B₂, G₁ y G₂:

La concentración de micotoxinas se determinó por HPLC a partir del medio de cultivo filtrado, recogido en la etapa anterior.

Se siguió el protocolo de extracción recomendado por la casa RomerLab® para la utilización de la columna de purificación Mycosep 224 AflaZON ®. En un tubo Falcon® se pesaron 2 gramos de

medio de cultivo. Se añadieron 8 mL del disolvente de extracción, compuesto por acetonitrilo y agua destilada (84:16, v/v) y se agitó en rotatubos durante 3 minutos.

Para evitar la saturación de la columna de adsorción, se diluyó la muestra (0,1 mL de muestra en 9,9 mL de disolvente de extracción) y se filtró con papel Whatman nº1.

Con pipeta estéril, se transfirieron 5 mL del extracto al tubo específico de Mycosep 224 ® y se pasó la columna para purificar el extracto.

Se recogieron 2 mL del extracto purificado en un vial ámbar de 4 mL, se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 50°C y una vez evaporado, se reconstituyó en 400 µL de fase móvil. Se analizó por HPLC (1100 Agilent Technologies) bajo las condiciones cromatográficas descritas a continuación:

- Columna ACE® HPLC C18 250 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula.
- Fase móvil: Agua MiliQ, Acetonitrilo y MeOH en proporción 40:10:50 (v/v/v)
- Flujo: 0,7 mL/minuto.
- Loop: 100 µL.
- Derivatización fotoquímica PHRED (LCTech UVE, Dorfen).
- Longitud de onda fijadas para el detector de fluorescencia (FLD):
 - Emisión: 435 nm.
 - Excitación: 365 nm.
- Tiempo de Análisis 30 minutos.

Dado que sólo las aflatoxinas B₂ y G₂ emiten suficiente fluorescencia, B₁ y G₁ deben ser derivatizadas antes de su detección para incrementar su señal fluorimétrica. Pueden ser derivatizadas por diferentes sistemas, como la derivatización por yodo y bromo. En este trabajo la derivatización fue llevada a cabo por un reactor fotoquímico para la detección mejorada (PHRED), que emite luz UV a 250 nm (Sobolwed y Dorner, 2002), El LCTech UVE se conecta entre el HPLC y el detector de fluorescencia. La utilización del PHRED puede aumentar la fluorescencia de B₁ y G₁ hasta 30 veces (Ariño, *et al.*, 2009). Además proporciona una forma de derivatización utilizando sólo luz UV, lo que simplifica la preparación de muestras y reduce los residuos químicos.

Debido a la escasez de trabajos *in vitro* sobre el efecto de los ácidos fenólicos en la síntesis de aflatoxinas, ha sido necesario optimizar y validar el método anteriormente descrito para la determinación por HPLC de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en medio de cultivo líquido YES.

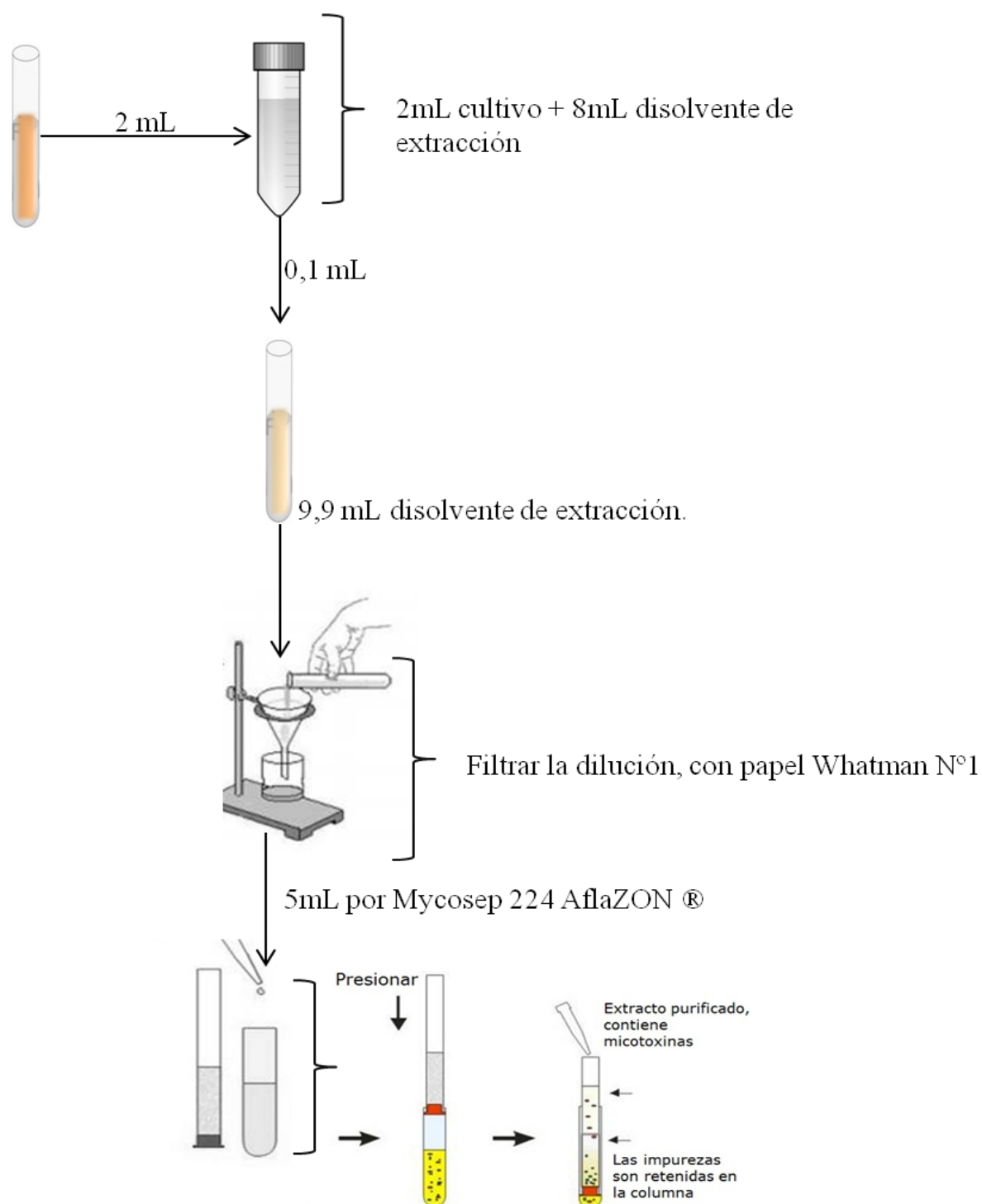


Figura 9. Esquema del proceso de extracción y purificación de la muestra

5.2. Optimización y validación de un método analítico para la determinación de aflatoxinas en medio de cultivo YES, yeast extract and sucrose.

La metodología que se va a optimizar en este trabajo, consiste en la extracción de las aflatoxinas presentes en las distintas muestras, resultado del estudio *in vitro* llevado a cabo para el evaluar el efecto de los distintos ácidos fenólicos sobre el crecimiento y biosíntesis de micotoxinas. Las aflatoxinas producidas por el moho, se extraen con una disolución metanólica por agitación, dilución y purificación del extracto orgánico mediante columnas adsorbentes. La determinación final de las toxinas se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC (high-performance liquid chromatography). El método desarrollado toma como referencia la norma UNE-EN ISO 1650:2011 “Determinación de aflatoxina B₁, y contenido total de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución” para establecer las condiciones cromatográficas, sustituyendo las columnas de inmunoafinidad para la purificación de las muestras por columnas adsorbentes tal y como describe el método oficial de la AOAC 994:08 (1994) “Aflatoxinas en maíz, almendras, nueces de Brasil, cacahuetes y pistachos. Método de columna Multifuncional (Mycosep)”.

5.1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.

5.2.1.1 Tiempos de retención.

El tiempo de retención (*t_r*), es el tiempo que tarda en eluirse un analito determinado desde el momento de la inyección. En unas condiciones determinadas una molécula siempre se eluye al mismo tiempo en un mismo sistema cromatográfico. Por tanto el *t_r* puede emplearse como un criterio de identificación de la molécula (Ferreira, 1997). Para comprobar cada uno de los tiempos correspondientes a cada aflatoxina así como el orden de elución, se inyectaron al comienzo de la optimización del método tres réplicas de un patrón de 10 ng/mL para G₁ y B₁ y 3 ng/mL para G₂ y B₂.

Una vez optimizado el método, se procedió a comprobar de nuevo los tiempos de retención de los picos, para lo que se inyectaron diez replicados de un patrón de 10 ng/mL para G₁ y B₁ y 3 ng/mL para G₂ y B₂, calculando la media de los tiempos de retención obtenidos y sus desviaciones estándar.

5.2.1.2 Longitudes de onda de excitación y emisión.

Los detectores selectivos y emplean una propiedad específica de los analitos, como puede ser su potencial redox, su capacidad para absorber luz de una longitud de onda determinada o la fluorescencia del analito, como es el caso del detector de fluorescencia (Ferreira, 1997). Los parámetros más importantes a optimizar en la detección de fluorescencia son las longitudes de onda de excitación y emisión.

Para la elección de la longitud de onda óptima, tanto de emisión como de excitación, se tuvo en cuenta la bibliografía. Para la longitud de onda de excitación, la mayoría de autores, coinciden en 365 nm (Razzaghi-Abyaneha, *et al.*, 2008; Gandomi, *et al.*, 2009; Sindhu, *et al.*, 2011; Cano-Sancho, *et al.*, 2013). Para elegir la longitud de onda de emisión se hicieron ensayos a 445, 425, 460 y 435 nm, de los autores anteriormente citados.

5.2.1.3. Composición de la fase móvil y flujo.

El flujo de la fase móvil es la velocidad a la cual ésta pasa a través de la columna, arrastrando con ella los distintos analitos. Según las recomendaciones de la casa comercial de la columna ACE®, el flujo de la columna debía ser 1mL/min, pero se ensayaron velocidades inferiores: 0,5 mL/min y 0,7 mL/min para determinar cuál de ellas conseguía una separación más eficiente de los picos.

Tomando como referencia la norma UNE-EN ISO 1650:2011 y el trabajo publicado por Ariño *et al.*, (2009), la fase móvil debía estar compuesta por una mezcla de agua, acetonitrilo y metanol. En este trabajo las proporciones eran (60:15:30 v/v/v), pero en los cromatogramas obtenidos, los picos no tenían una separación adecuada para su cuantificación. Para solventar este problema, se probaron diferentes composiciones de fases móviles obtenidas de la bibliografía, así como pequeñas modificaciones a partir de las anteriores, como aportaciones experimentales propias (Tabla 4).

Agua %	Acetonitrilo %	Metanol %	Autores.
30	10	10	(AOAC 991.31, 1994)
40	10	50	
60	15	30	(Ariño <i>et al.</i> , 2009)
55	15	30	
40	10	10	(AOAC 994.08, 1997)
28,1	10,5	61,4	(Jager <i>et al.</i> , 2013)

Tabla 4. Composición de las fases móviles ensayadas.

5.2.2. Purificación de la muestra: columnas de adsorción.

Se probaron dos tipos de columnas de adsorción, de dos casas comerciales diferentes Mycosep® AflaZON 224 de RomerLab® y la columna Isolute® Myco de la casa Biotage®, la primera indicada para el análisis de aflatoxinas y zearalenona y la segunda para un grupo más amplio de micotoxinas tales como, las nombradas anteriormente más, fumonisinas, patulina, ergotoxinas y ocratoxina A. En los dos casos, las matrices recomendadas por las casas comerciales son granos de cereal, como el maíz, trigo y centeno; y frutos secos como los cacahuetes y las nueces.

Se fortificaron dos muestras de maíz libre de aflatoxinas, a 10 ng/mL de G₁ y B₁ y 3 ng/mL G₂ y B₂ y, siguiendo el protocolo de extracción de cada columna, se procedió al análisis por HPLC. Con la columna seleccionada, se hizo el estudio de recuperación explicado en el punto 5.2.4.

5.3. Validación del metodo analítico.

Según la Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 (2002/657/CE), por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados”, la validación, es la confirmación mediante exámen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto.

La validación de este método se ha realizado tomando como referencia el Reglamento (CE) N° 401/2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

5.3.1. Especificidad.

Es la capacidad de un método para distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. (Decisión 2002/567/CE). Para distinguir las aflatoxinas, de otras sustancias interferentes, se analizaron:

- Disolvente de inyección.
- Blanco de proceso. Se realiza todo el procedimiento analítico, extracción, purificación, y determinación cromatográfica pero omitiendo la muestra.
- Muestra blanco de medio de cultivo, sin producción de aflatoxinas.
- Solución patrón de 10 ng/mL de aflatoxinas B₁ y G₁ y 3 ng/mL de G₂ y B₂.

Todo ello para comprobar que no existían solapamientos de picos, que estos están formados por un solo componente, lo que permite una cuantificación correcta.

5.3.2. Linealidad:

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Viene representada a través de una recta de regresión, que es la utilizada para calcular por interpolación, las concentraciones de aflatoxinas en las distintas muestras. Al no existir efecto matriz relevante en el análisis de las muestras de medio de cultivo, la calibración se realizó por el método del patrón externo. Las concentraciones elegidas para la recta de calibrado fueron, de 0,5 ng/mL a 10 ng/mL para B₁ y G₁ y de 0,15 ng/mL a 3 ng/mL para B₂ y G₂. Para evaluar la linealidad se calculó el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2) de cuatro réplicas de rectas obtenidas para cada compuesto, así como la desviación estándar.

5.3.3 Sensibilidad:

Capacidad del método analítico para discriminar interferencias en la concentración de analito. Para calcularla, determinamos el LD y LC.

5.3.3.1 Limite de detección (LD):

Es la concentración más baja de analito, que puede ser medida por el equipo. Para calcular este valor, se realizaron diluciones de la solución patrón, disminuyendo la concentración de analito hasta que el equipo no puede detectarlo. Se partió de una concentración de 0,02 ng/mL para el caso de B₁ y G₁ y de 0,006 ng/mL para el caso de B₂ y G₂. Se obtuvo la concentración de analito por interpolación en la recta de calibrado.

Se hicieron seis réplicas de este ensayo para cada micotoxina y se calcularon las concentraciones medias, así como las desviaciones estándar. El límite de detección del método se calculó sumando a la concentración más baja analizada, tres veces la desviación estándar (Pizzutti *et al.*, 2014).

5.3.3.2 Limite de Cuantificación (LC)

El límite de cuantificación, es la concentración mínima de analito que puede cuantificarse con una certeza estadística razonable.

Del mismo modo, el límite de cuantificación se calculó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito y sumando a la concentración mínima detectada por el equipo, diez veces la desviación estándar.

5.3.4. Exactitud (Recuperación).

La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado y se obtiene determinando la veracidad y la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) (Decision de la Comisión 2002/657/CE).

Al no disponer de material de referencia certificado que indique un valor de referencia aceptado, se llevó a cabo un estudio de recuperación enriqueciendo seis muestras de caldo de cultivo estéril, a un nivel de 10 ng/mL para B₁ y G₁ y de 3 ng/mL para B₂ y G₂.

El enriquecimiento de las muestras se realizó antes de la etapa de extracción, para determinar el porcentaje de recuperación global del método.

Para hallar este porcentaje de recuperación, se calcularon los resultados obtenidos en las muestras enriquecidas, con las ecuaciones de la recta procedentes de las rectas de calibración para cada aflatoxina.

5.3.5 Precisión

Grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas. La precisión suele expresarse como desviación estándar relativa de los resultados de los ensayos. Cuanto mayor es la desviación estándar menor es la precisión (Decision de la Comisión 2002/657/CE).

Estas condiciones estipuladas pueden variar, algunos ejemplos son el laboratorio, los reactivos utilizados, el analista, el equipo de HPLC o el día en que se realizaron los ensayos. Estas condiciones pueden modificar la precisión del método.

Para determinar este parámetro se analizaron seis muestras independientes de caldo de cultivo estéril, contaminado a un nivel de 10 ng/mL para B₁ y G₁ y de 3 ng/mL para B₂ y G₂. La precisión se estudió bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad.

5.3.5.1 Precisión de la inyección

Además de lo anteriormente descrito, se hizo un ensayo de precisión de la inyección. Con este parámetro se pretende conocer las posibles fluctuaciones debidas a componentes del equipo como pueden ser las bombas o los detectores, en un corto periodo de tiempo.

Para ello se inyectó un patrón de 10 ng/mL para las aflatoxinas B₁ y G₁ y de 3 ng/mL para las aflatoxinas B₂ y G₂, diez veces consecutivas el mismo día, y se calculó la repetibilidad, mediante la determinación de las desviaciones estándar relativas de las áreas de pico cromatográficas correspondientes a cada aflatoxina.

5.3.5.2. Repetibilidad

Es la desviación estándar relativa de los ensayos realizados bajo condiciones de repetibilidad (RSD_r%). Condiciones de repetibilidad son aquellas en las que, un mismo operador, obtiene resultados de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo.

La repetibilidad del método se determinó, calculando la desviación estándar relativa de los resultados obtenidos tras analizar tres muestras de caldo de cultivo estéril, contaminado con 10 ng/mL de aflatoxinas B₁ y G₁ y 3 ng/mL de aflatoxinas B₂ y G₂. Las muestras fueron extraídas el mismo día, por el mismo analista y analizadas con el mismo equipo HPLC.

5.3.5.3. Reproducibilidad:

Se define como la desviación estándar relativa en condiciones de reproducibilidad (RDS_R%) obtenida tras analizar varias veces una misma muestra en días distintos, pudiendo variar condiciones tales como, el equipo de medida, el analista y días de análisis.

En este caso, hablamos de reproducibilidad intralaboratorio. Cuando las medidas se realizan en laboratorios distintos, son estudios de intercomparación.

El estudio de reproducibilidad fue llevado a cabo por el mismo analista, el mismo equipo pero en tres días diferentes. Las muestras analizadas fueron las mismas que las indicadas en el apartado anterior: tres muestras de caldo de cultivo estéril, contaminado a 10 ng/mL de aflatoxinas B₁ y G₁ y 3 ng/mL de aflatoxinas B₂ y G₂.

6. Resultados y Discusión.

Para poder considerar los resultados obtenidos en el estudio *in vitro* realizado en este trabajo, es necesario primero conocer los resultados del proceso de optimización y validación del método utilizado para la cuantificación de las aflatoxinas.

6.1. Optimización del método analítico.

6.1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.

6.1.1.1. Tiempos de retención.

En los cromatogramas obtenidos (figura 10) pudimos observar los cuatro picos correspondientes a las cuatro aflatoxinas estudiadas. El orden de elución de estos picos fue, G₂, G₁, B₂ y B₁. Los tiempos de retención fueron, 9,204; 10,122; 10,789; 11,979 minutos.

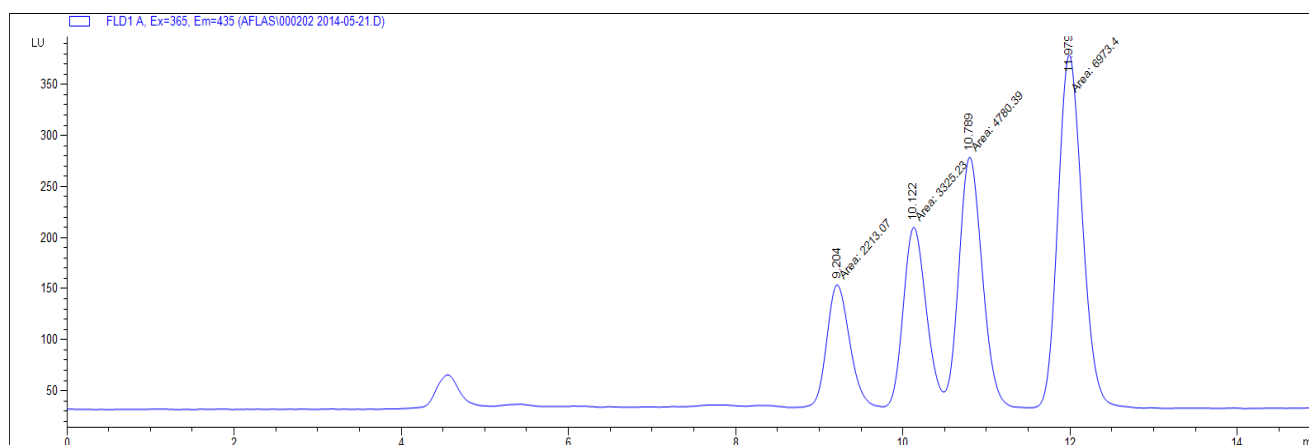


Figura 10. Patrón de 10 ng/mL para G₁ y B₁ y de 3 ng/mL para G₂ y B₂. Tiempos de retención y áreas.

Al finalizar el proceso de optimización, se comprobaron de nuevo los tiempos de retención de las aflatoxinas. Se inyectaron diez réplicas de un patrón de 10 ng/mL para G₁ y B₁ y de 3 ng/mL para G₂ y B₂. Los resultados se muestran en la tabla 5.

	DS	CV	Tr medio
G ₂	0,012	0,135	9,203
G ₁	0,015	0,157	10,119
B ₂	0,015	0,149	10,781
B ₁	0,018	0,158	11,967

Tabla 5. Tiempos de retención: Desviación estándar y Coeficiente de Variación.

6.1.1.2. Longitudes de onda.

Es bien sabido que las aflatoxinas se detectan con detector de fluorescencia, con unos determinados valores de longitud de onda de excitación y emisión, expresados en nm. Para seleccionar la longitud de onda de emisión adecuada, se compararon las áreas de pico obtenidas a distintas longitudes de onda, eligiendo la que proporcionaba un área de pico mayor para cada aflatoxina analizada. Para la longitud de onda de emisión se eligió 435nm, valor que coincide con el trabajo de (Ariño *et al.*, 2009).

Para la longitud de onda de excitación, se fijó en 365 nm, valor más utilizado por lo autores (Gandomi, 2009; Polixeni, 2009; Sindhu, 2011; Cano-Sancho, 2013; Accinelli, 2014).

En las figuras 11 y 12, se representan algunos cromatogramas obtenidos con distintas longitudes de onda ensayadas.

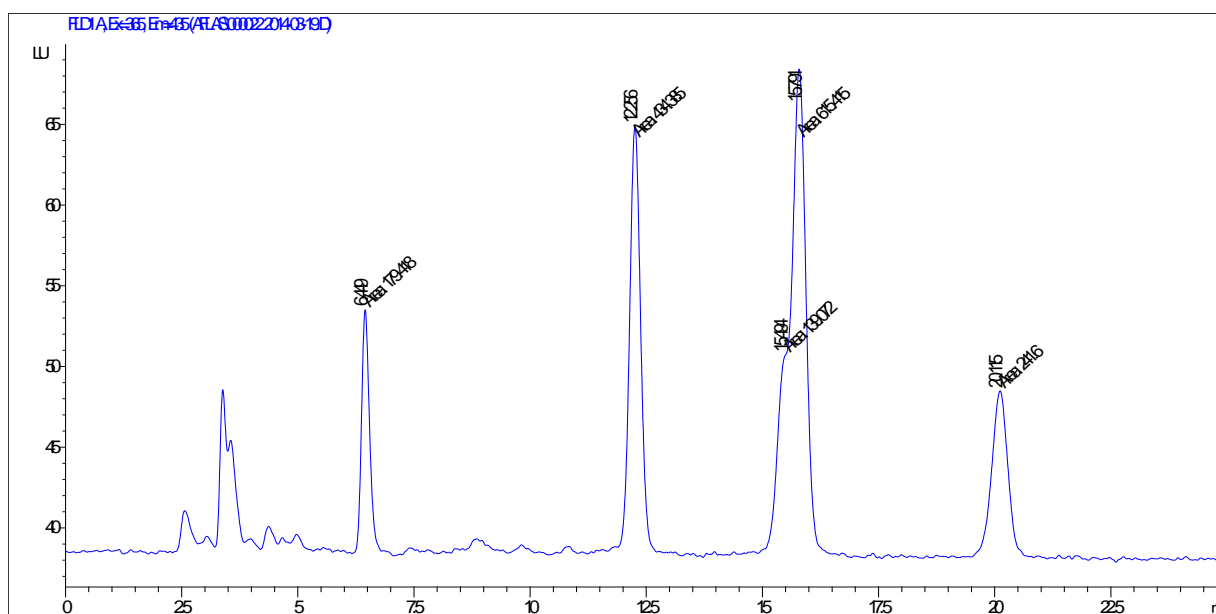


Figura 11. Cromatograma a 365nm de excitación (ex.) 435 nm de emisión (em.), patrón de 10 ng/mL para G1 y B1 y de 3 ng/mL para G2 y B2.

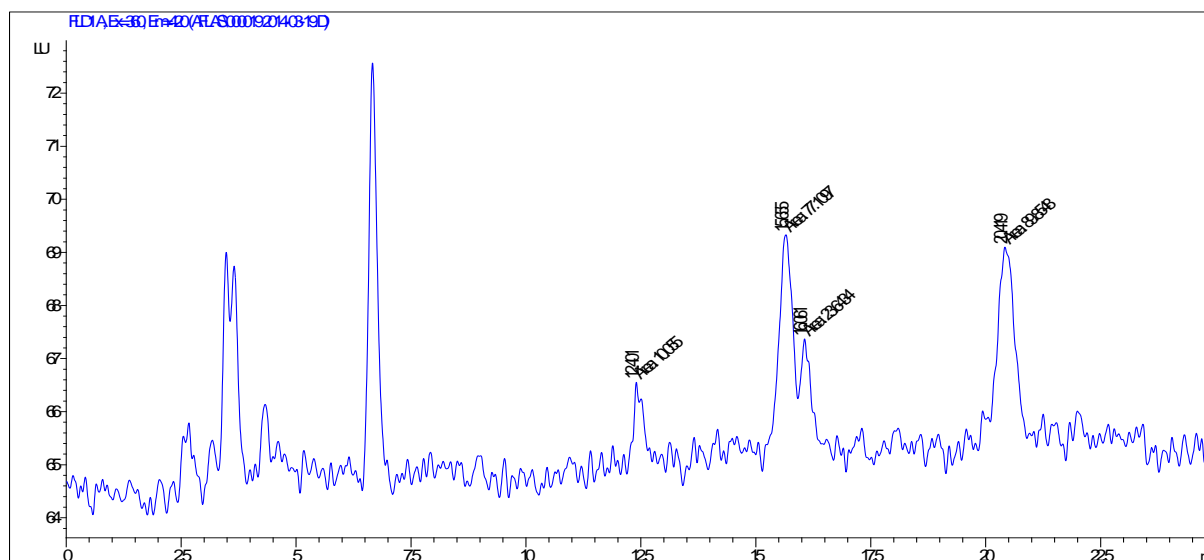


Figura 12. Cromatograma a 365nm de excitación (ex.) 420 nm de emisión (em.), patrón de 10 ng/mL para G1 y B1 y de 3 ng/mL para G2 y B2.

6.1.1.3. Composición de la fase móvil y flujo.

La primera fase móvil ensayada fue la del método oficial de la AOAC 991.31, compuesta por agua, acetonitrilo y metanol en proporción 30:10:10 (v/v/v). Con una mayor proporción de agua en este caso, se observó que los picos correspondientes a las aflatoxinas G₁ y B₂ se solapaban. Con la fase móvil utilizada por Ariño *et al.*, (2009), compuesta por agua, acetonitrilo y metanol en proporción 60:15:30 (v/v/v) (Figura 13), ocurría lo mismo pero en menor medida.

Se probó con una fase móvil con una proporción de metanol mayor, utilizada en el trabajo de Jager *et al.*, (2013), compuesta por 28,1:10,5:61,4 de agua, acetonitrilo y metanol respectivamente. En este caso, aunque los picos de las aflatoxinas de G₁ y G₂ no se solapaban, la separación entre los picos todavía no era satisfactoria (Figura 14).

Se ensayó experimentalmente una fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo y metanol en proporción 40:10:50 v/v/v. Con la que se logró disminuir las interferencias y lograr una correcta separación cromatográfica (Figura 17).

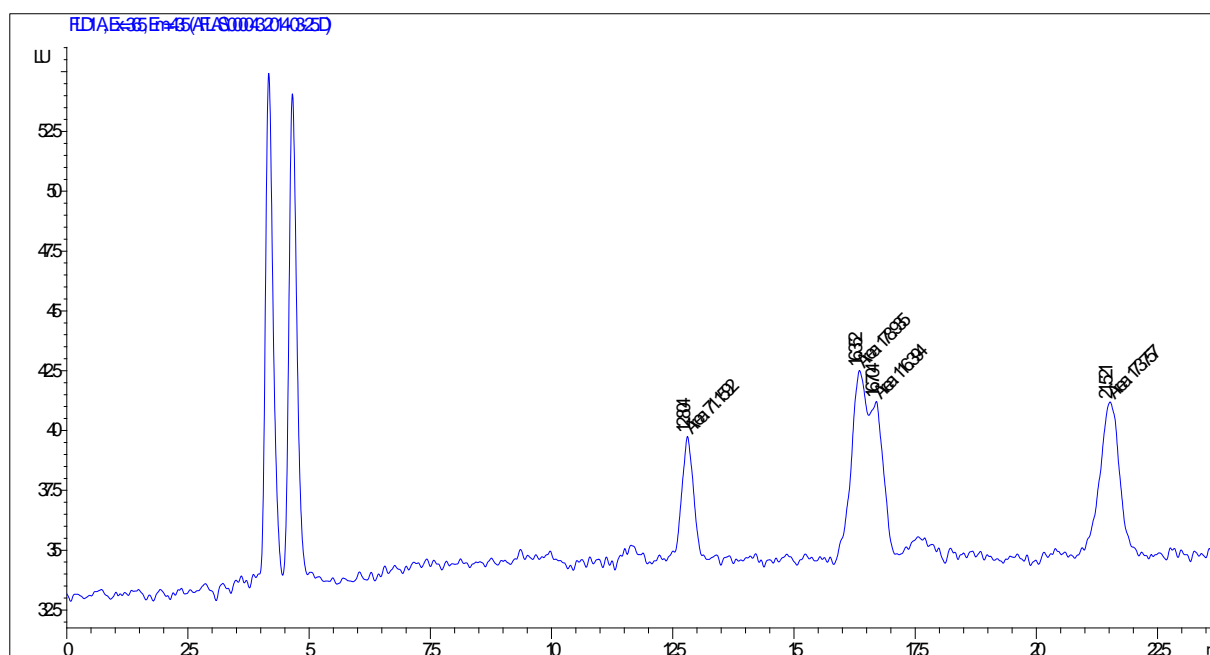


Figura 13. Cromatograma a 365nm de ex. y 435 nm de em. de patrón de 10 ng/mL para G1 y B1 y de 3 ng/mL para G2 y B2 con fase móvil agua/acetonitrilo/metanol (60:15:30).

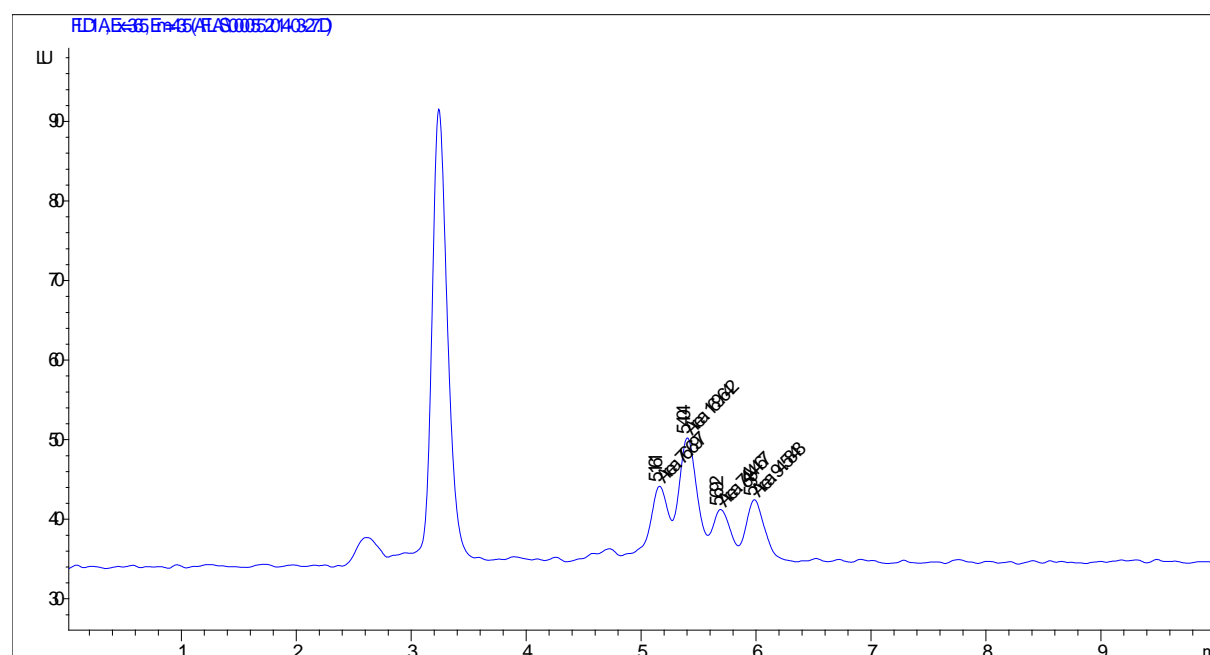


Figura 14. Cromatograma a 365nm de ex. y 435 nm de em. de patrón de 10 ng/mL para G1 y B1 y de 3 ng/mL para G2 y B2 con fase móvil agua/acetonitrilo/metanol (60:15:30).

Para optimizar la separación de los picos con la fase móvil elegida, se ensayaron dos velocidades de flujo, 0,5 mL/min y 0,7 mL/min, distintas a la recomendada por la casa comercial ACE® de 1 mL/min. La elegida fue la de 0,7 mL/min, ya que conseguía unos tiempos de retención menores, sin comprometer la resolución cromatográfica.

6.1.2. Purificación, columnas de adsorción.

Debido a la presencia de materiales interferentes en los extractos de las muestras (cultivos *in vitro*), era preciso una fase de purificación o cleanup para obtener unos extractos limpios que ofrecieran buenas respuestas cromatográficas. Se hizo un ensayo con dos columnas de adsorción, de dos casas comerciales diferentes Mycosep® AflaZON 224 de RomerLab® y Isolute® Myco de Biotage®, la primera indicada para el análisis de aflatoxinas y zearalenona y la segunda para un grupo más amplio de micotoxinas tales como, las nombradas anteriormente más, fumonisinas, patulina, ergotoxinas y ocratoxina A. En los dos casos, las matrices recomendadas por las casas comerciales son granos de cereal, como el maíz, trigo y centeno; y frutos secos como los cacahuets y las nueces. A diferencia de las columnas de inmunoafinidad, las columnas de extracción en fase sólida, son rentables, fáciles de usar y no tienen requisitos especiales de conservación.

Para seleccionar la columna adecuada se eligió una muestra de maíz, matriz alimentaria recomendada por ambas casas comerciales, libre de aflatoxinas y se fortificó a 10 ng/ml para G₁ y B₁ y 3 ng/mL para B₂ y G₂, siguiendo el protocolo de extracción de cada casa, se analizó mediante HPLC con las condiciones cromatográficas optimizadas. La columna Mycosep® fue la que presentó una purificación más eficiente (Figura 15). En contra, el cromatograma obtenido al utilizar la columna Isolute® mostró interferencias en los tiempos de retención de las aflatoxinas, que no permitían observar los picos correctamente (Figura 16).

Con columna seleccionada, Mycosep®, se realizó un estudio de recuperación explicado en el punto 6.2.4 en el cual se utilizó como matriz, el medio de cultivo empleado para el estudio *in vitro*, compuesto por extracto de levadura y sacarosa.

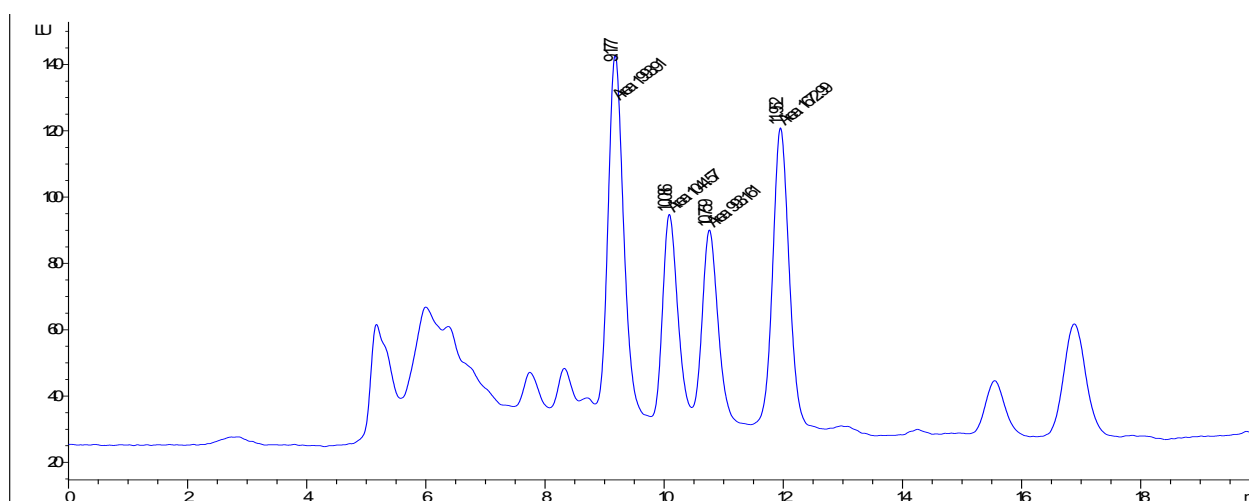


Figura 15. Maíz fortificado en 10 ng/mL para G₁ y B₁ y de 3 ng/mL para G₂ y B₂. Mycosep® AflaZON 224.

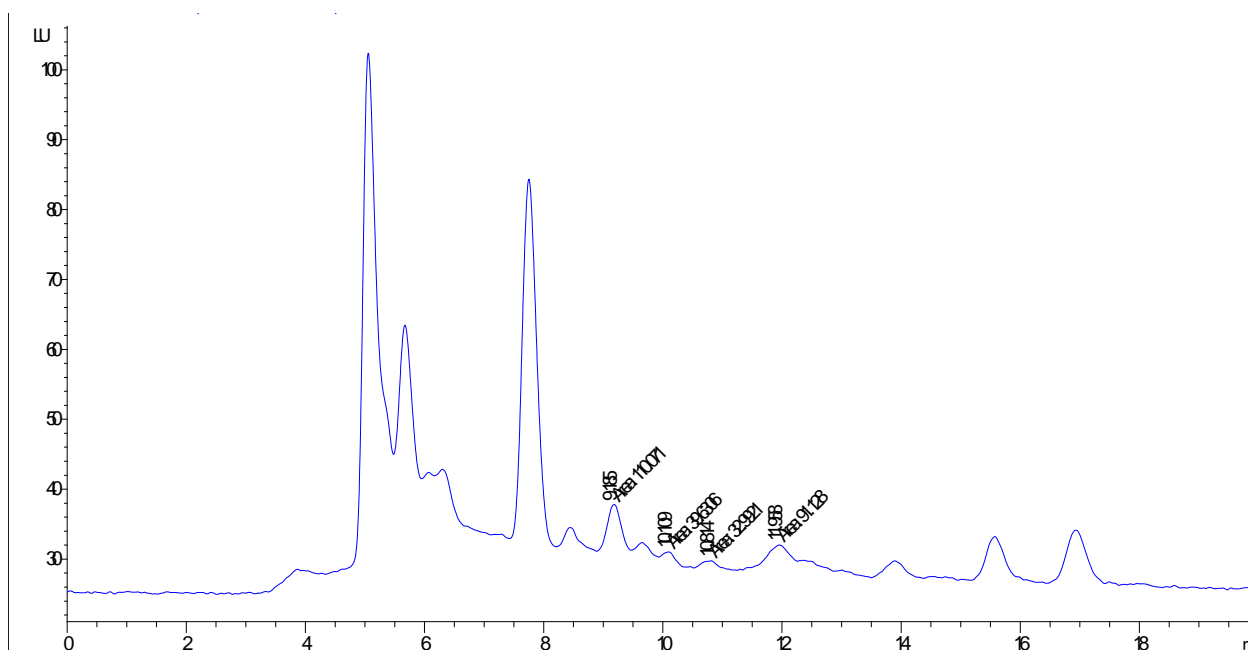


Figura 16. Maíz fortificado en 10 ng/mL para G1 y B1 y de 3 ng/mL para G2 y B2. Isolute® Myco.

6.2 Validación.

Una vez optimizadas las condiciones de trabajo, se procedió a validar el método tomando como referencia el Reglamento (CE) N° 401/2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

6.2.1. Especificidad.

En primer lugar se muestra un cromatograma patrón de 10ng/ml para G₁ y B₁ y 3 ng/mL para B₂ y G₂, a modo de ejemplo para reconocer los tiempos de retención de cada aflatoxina (Figura 17).

A continuación, en la figura 18 se puede observar una inyección del blanco de proceso. En el cromatogramas se puede observar que tanto los disolventes de extracción y purificación, como la fase móvil no aportan interferencias al cromatograma en los tiempos de retención de las aflatoxinas estudiadas.

Por último, en la figura 19, se puede observar una muestra de medio de cultivo, libre de aflatoxinas, en donde no aparece ninguno de los picos correspondientes a las aflatoxinas, ni interferencias en los tiempos de retención correspondientes las mismas.

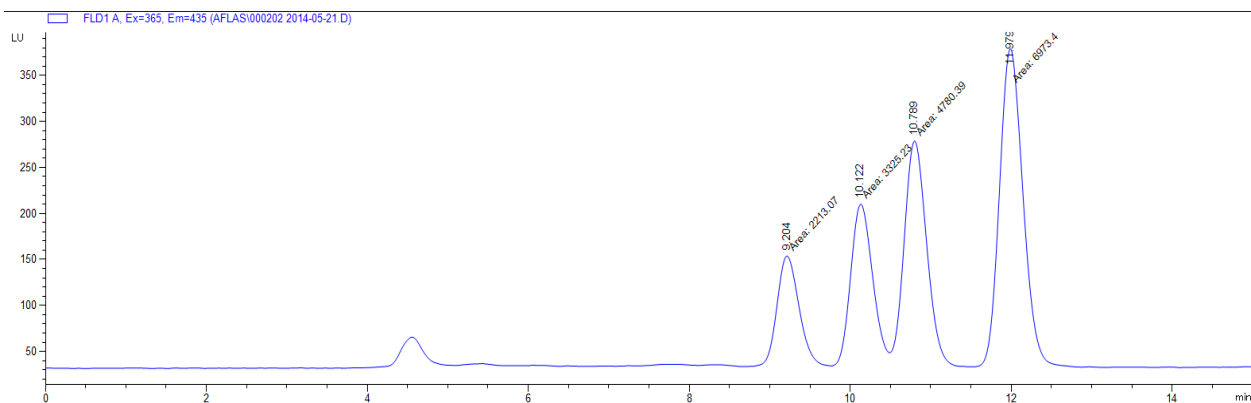


Figura 17. Cromatograma a 365 nm de ex. y 435 nm de em. de un patrón de 10 ng/ml para G1 y B1 y 3 ng/mL para B2 y G2, Fase móvil agua/acetonitrilo/metanol (40:10:50).

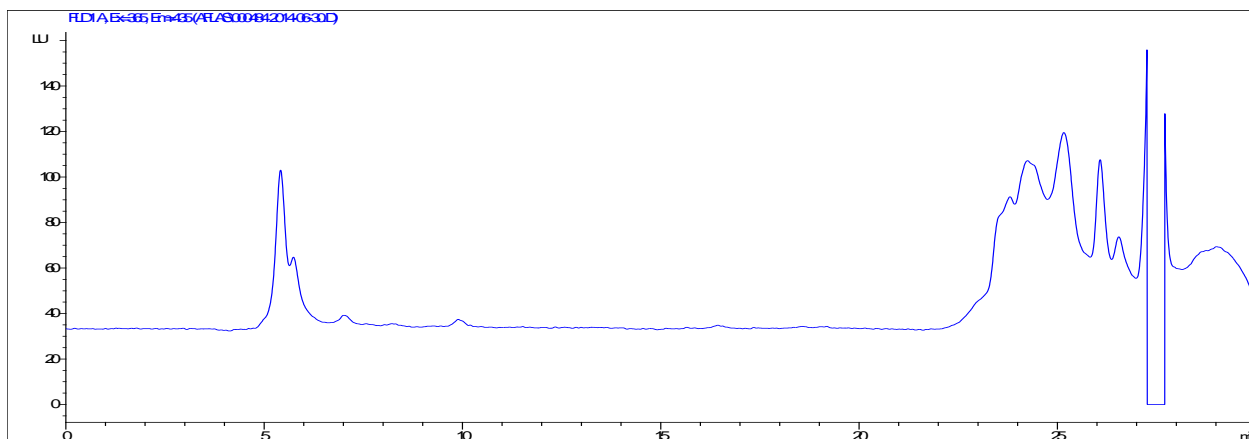


Figura 18. Blanco de proceso.

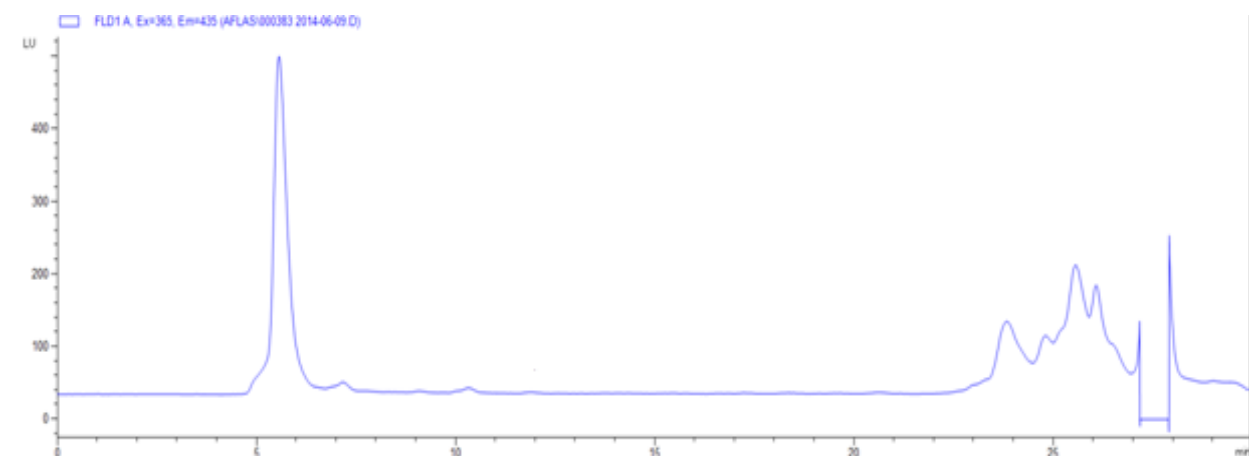


Figura 19. Muestra, medio de cultivo YES, libre de aflatoxina.

6.2.2. Linealidad.

Los resultados del análisis de cuatro rectas de calibrado, para cada aflatoxina estudiada se muestran en la tabla 6. Para las aflatoxinas B₁ y B₂ los coeficientes de regresión (r^2) medios fueron de 0,999 y 0,998 respectivamente, para G₁ y G₂ fue de 0,994. En la Figura 20 se representa la recta de calibrado de cada aflatoxina y el intervalo de concentración.

B1	Coeficiente de correlación de Pearson (r)		Coeficiente de regresion (r2)	B2	Coeficiente de correlación de Pearson (r)		Coeficiente de regresion (r2)
	Recta				Recta		
	1	0,999	0,999		1	1,000	0,999
	2	0,998	0,996		2	0,997	0,995
	3	1,000	1,000		3	0,999	0,998
	4	1,000	1,000		4	1,000	1,000
	Media	0,999	0,999		Media	0,999	0,998
	SD	0,001	0,002		SD	0,001	0,002
RSD%	0,082	0,164	RSD%	0,104	0,207		
G2	Coeficiente de correlación de Pearson (r)		Coeficiente de regresion (r2)	G1	Coeficiente de correlación de Pearson (r)		Coeficiente de regresion (r2)
	Recta				Recta		
	1	0,998	0,995		1	0,999	0,998
	2	0,997	0,994		2	0,998	0,997
	3	1,000	1,000		3	1,000	1,000
	4	0,993	0,987		4	0,990	0,980
	Media	0,997	0,994		Media	0,997	0,994
	SD	0,002	0,005		SD	0,004	0,008
RSD%	0,236	0,472	RSD%	0,392	0,783		

Tabla 6. Estudio de linealidad, cuatro rectas de calibrado para cada aflatoxina.

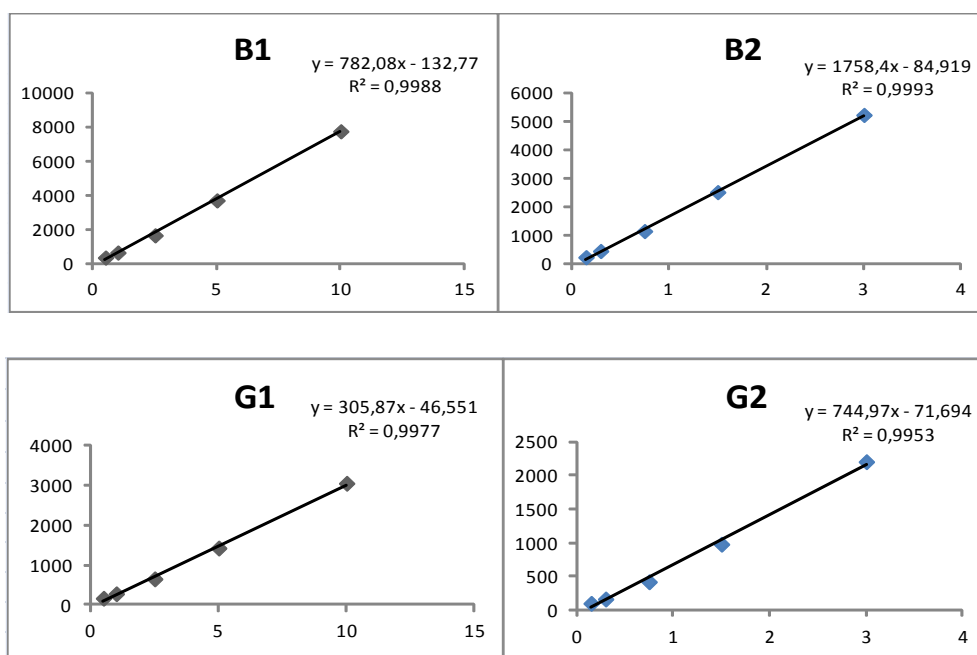


Figura 20. Rectas de calibrado con concentraciones de 0,5 ng/mL a 10 ng/mL para B₁ y G₁ y de 0,15 ng/mL a 3 ng/mL para B₂ y G₂

6.2.3. Sensibilidad.6.2.3.1. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Tal y como se describe en el apartado de “material y métodos”, los límites de detección y cuantificación obtenidos para cada micotoxina, tras la inyección de seis réplicas de cada micotoxina se representan en la tabla 7.

Aflatoxina	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
G₂	0,14	0,28
G₁	0,36	0,63
B₂	0,11	0,19
B₁	0,35	0,59

Tabla 7. Límites de detección y cuantificación.

De acuerdo con los valores obtenidos, el método presenta una mayor sensibilidad para detectar las aflatoxinas G₂ y B₂. A continuación, en la tabla 8, se pueden observar límites de detección y cuantificación obtenidos por otros autores, valores que varían respecto al método y equipo utilizados.

Autor	G2 (µg Kg⁻¹) LD (LC)	G1 (µg Kg⁻¹) LD (LC)	B2 (µg Kg⁻¹) LD (LC)	B1 (µg Kg⁻¹) LD (LC)
(Campone <i>et al.</i> , 2011)	0,10 (0,33)	0,17 (0,57)	0,03 (0,10)	0,04 (0,12)
(Sook <i>et al.</i> , 2007)	1,25 (2,5)	0,40 (1,3)	0,13 (0,4)	0,08 (0,15)
(Golge <i>et al.</i> , 2013)	0,113 (0,140)	0,105 (0,115)	0,104 (0,110)	0,104 (0,110)

Tabla 8. Límites de detección y cuantificación obtenidos por otros autores, utilizando equipos HPLC.

6.2.4. Exactitud (Recuperación).

Al no disponer de material de referencia certificado, el estudio de este parámetro se llevo a cabo enriqueciendo seis muestras de caldo de cultivo YES estéril, a un nivel de 10 ng/mL para B₁ y G₁ y de 3 ng/mL para B₂ y G₂.

De acuerdo con el Reglamento (CE) 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en productos alimenticios, los valores de recuperación para concentraciones de aflatoxinas entre 1-10 µg/kg deben estar entre el 70 y el 110%. En nuestro caso, los valores obtenidos se presentan en la tabla 9. Las recuperaciones obtenidas se encuentran dentro de los límites establecidos por la legislación.

	AF G ₂	AF G ₁	AF B ₂	AF G ₂
Enriquecimiento a 10 ng/mL para B ₁ y G ₁ y de 3 ng/mL para B ₂ y G ₂ .	80,99%	78,23%	94,59%	80,69%

Tabla 9. Porcentajes de recuperación para cada aflatoxina.

6.2.5. Precisión.

Para determinar este parámetro se analizaron seis muestras independientes de caldo de cultivo estéril, contaminado a 10 ng/mL para B₁ y G₁ y de 3 ng/mL para B₂ y G₂.

6.2.5.1. Precisión de la inyección.

Se calcularon las desviaciones estándar relativas obtenidas tras inyectar diez veces, un patrón de calibración a concentraciones de 10 ng/mL para B₁ y G₁ y de 3 ng/mL para B₂ y G₂. Como se puede observar en la tabla 10, los valores obtenidos para cada aflatoxinas son bajos.

	AF G ₂	AF G ₁	AF B ₂	AF G ₂
Desviación estándar relativa (RSD%)	1,126	1,956	3,750	3,471

Tabla 10. RSD% Desviación estándar relativa de cada aflatoxina en la inyección.

6.2.5.2. Reproducibilidad y repetibilidad del método:

Según el Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión, la reproducibilidad del método puede calcularse a partir de la ecuación de Horwitz.

$$CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Donde C es la fracción de masa expresada como potencia (exponente) de 10. Y la repetibilidad, puede calcularse como 0,66 veces el valor de reproducibilidad obtenido a partir de la ecuación anterior.

De acuerdo con las indicaciones anteriores, los coeficientes de variación obtenidos para las aflatoxinas B₁ y G₁, en condiciones de reproducibilidad deben ser inferiores a 32% y para las aflatoxinas B₂ y G₂, inferiores a 38,35%.

En condiciones de repetibilidad, los coeficientes de variación para B₁ y G₁ deben ser inferiores al 21,12%, y para las aflatoxinas B₂ y G₂ inferiores al 25,31%. Como se puede observar en la tabla 11, los valores obtenidos para este método, cumplen los criterios establecidos en la legislación vigente.

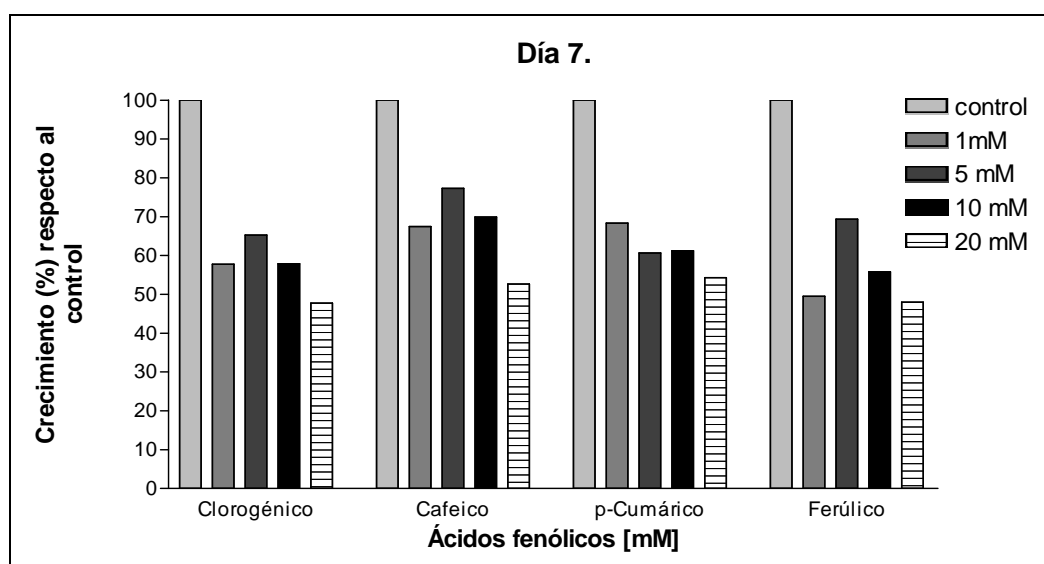
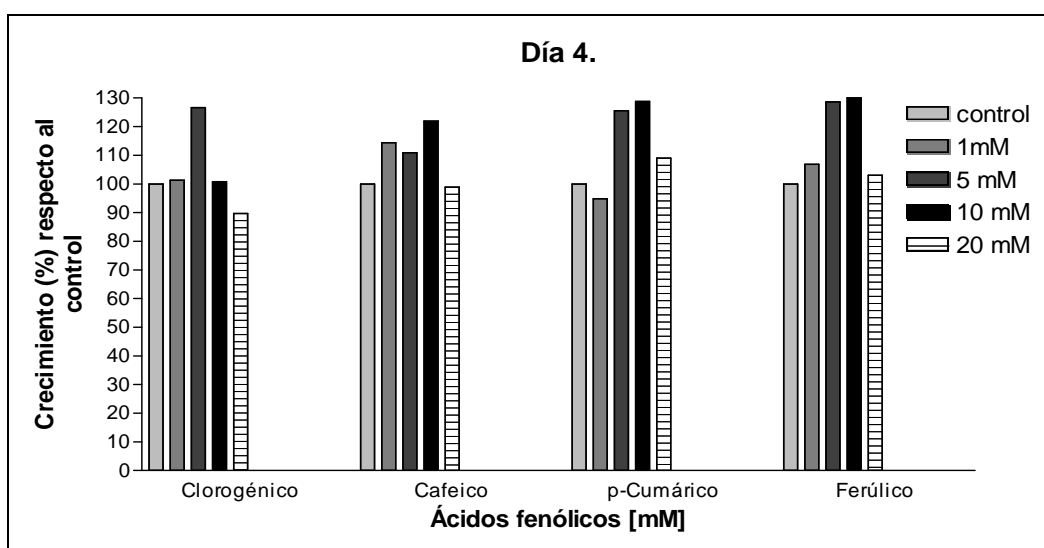
CV%	AF G ₁	AF G ₂	AF B ₂	AF B ₁
Repetibilidad	9,05	4,20	10,89	5,53
Reproducibilidad	8,68	9,91	13,71	5,80

Tabla 11. Coeficientes de variación para cada aflatoxina

Además, según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV) para el análisis repetido de un material de referencia o enriquecido, en condiciones de reproducibilidad, con fracciones de masa inferiores a 100 µg/kg, recomienda que los CV de las concentraciones inferiores a 100 µg/kg, sean lo más bajos posible, dado que la aplicación de la ecuación de Horwitz a estos niveles de enriquecimiento, conduce a valores inaceptablemente elevados.

6.3 Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de *A. parasiticus* CECT 2682.

Para determinar el efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento del moho, se pesaron las muestras de micelio seco y se compararon con el control correspondiente al día de ensayo. Los resultados se expresaron en porcentaje de crecimiento, respecto al control. Los resultados expresados en gramos de micelio seco, se pueden observar en el Anexo 1.



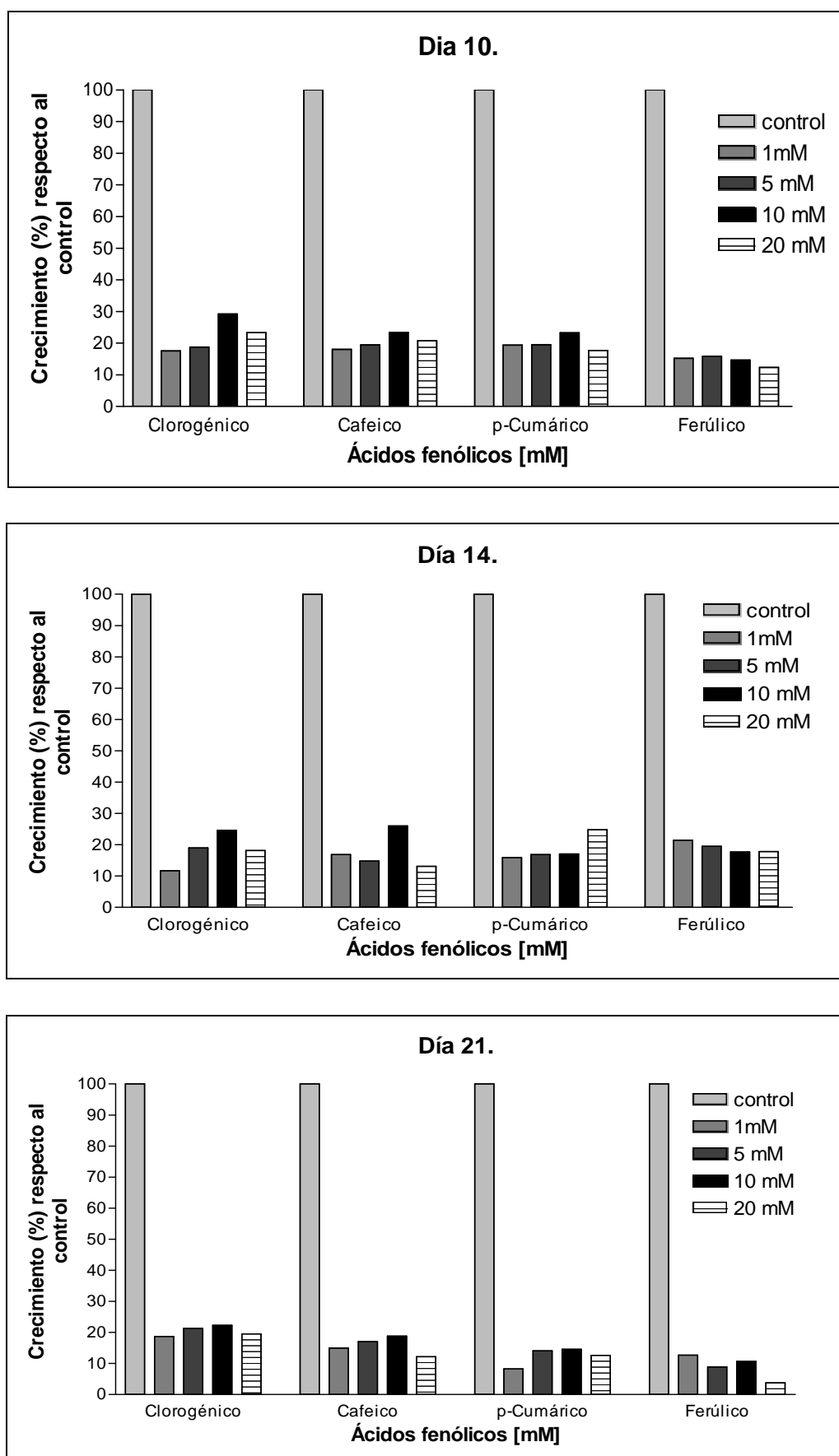


Figura 21. Efecto de las concentraciones de ácidos fenólicos sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* CECT 2682, en medio de cultivo líquido YES.

Como se puede observar en las gráficas anteriores (Figura 21), los resultados sugieren una mayor inhibición del crecimiento conforme aumenta la concentración de ácido fenólico, así como el tiempo transcurrido.

En el cuarto día de ensayo se puede observar que, concentraciones bajas de ácidos fenólicos, de hasta 10 mM podrían favorecer el crecimiento del organismo. Efecto que desaparece al séptimo día de ensayo, donde, a igual concentración de ácido fenólico, el crecimiento se ve reducido respecto al control. Este efecto coincide con lo descrito por otros autores, como Ferrochio, *et al.* (2013), los cuales demostraron, sobre agar a base de maíz, que el ácido ferúlico, a concentraciones inferiores a 10 mM podía favorecer el crecimiento de cepas de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum*.

Ninguno de los cuatro ácidos fenólicos, a las concentraciones ensayadas durante 21 días, han podido inhibir por completo el crecimiento del moho.

6.4. Efecto combinado de los ácidos fenólicos y el crecimiento del moho sobre el pH del medio

YES.

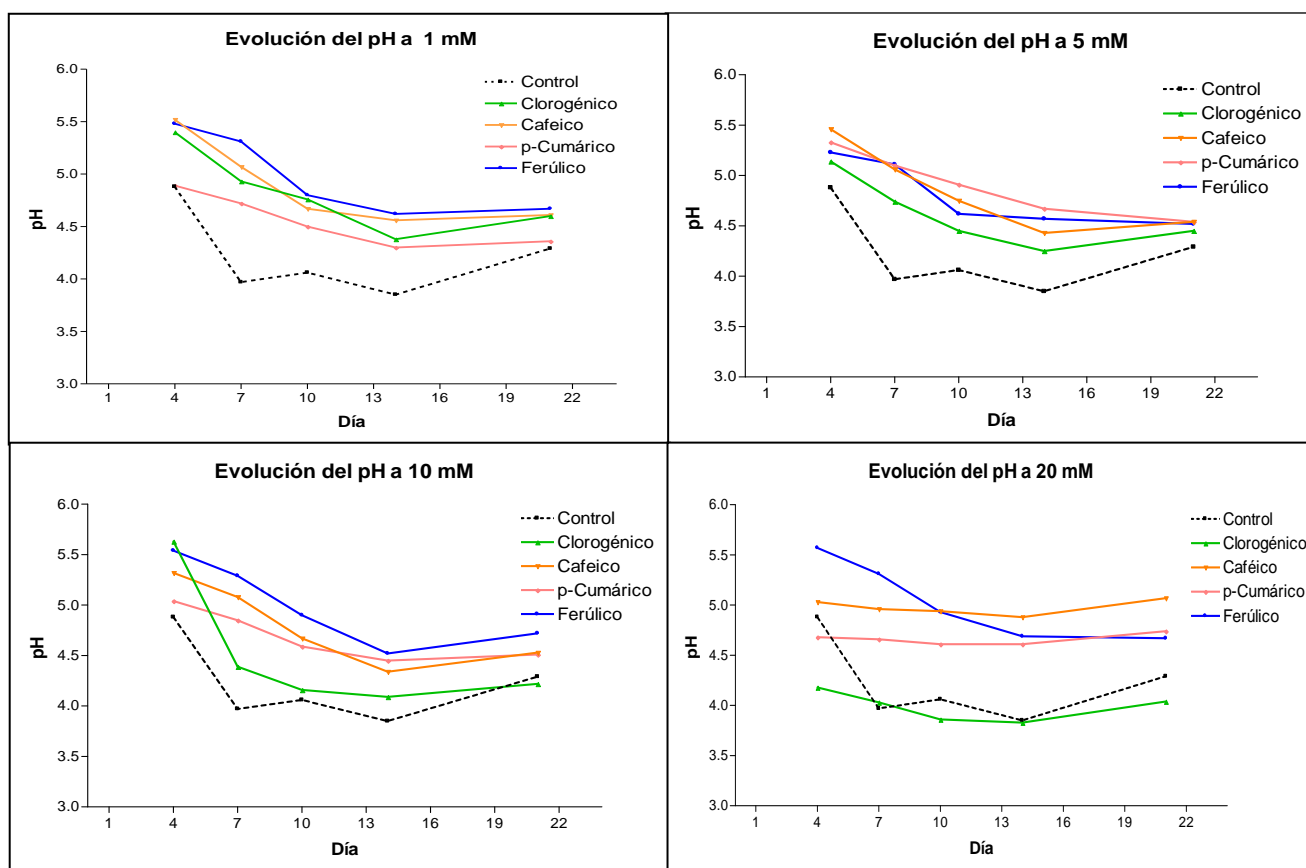


Figura 22. Evolución del pH en 21 días de experimento, a distintas concentraciones de ácidos fenólicos.

Como se puede observar en las gráficas anteriores (figura 22), el pH del medio de cultivo en presencia de ácidos fenólicos es superior al pH del control. El pH disminuye a lo largo del tiempo, pero se ve poco influido por la concentración de ácido fenólico. A excepción del ácido clorogénico que disminuye el pH del medio, incluso por debajo del control, a concentraciones de 20 mM.

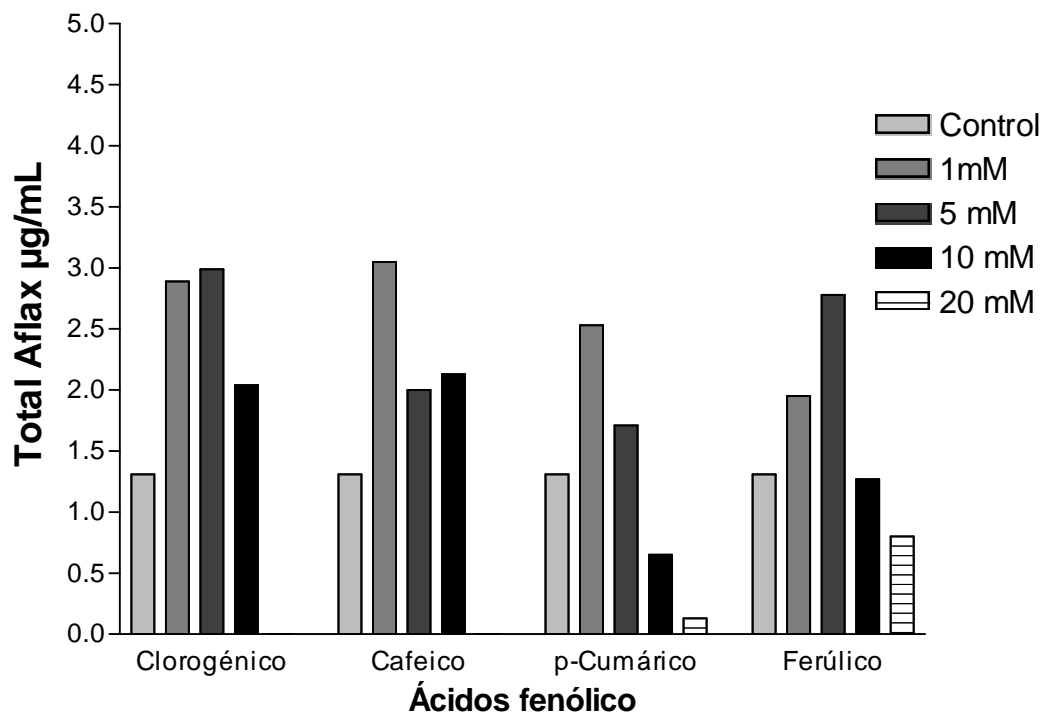
Los compuestos fenólicos como antioxidantes, tiene la capacidad de llevar a cabo reacciones redox en la membrana plasmática de la célula y secuestrar electrones procedentes del proceso de respiración. Un estudio llevado a cabo por Lacombe, (2010) sostiene que la capacidad antimicrobiana de los compuestos fenólicos es independiente del pH, dado que las reacciones redox implican transporte de electrones y no de hidrógeno, H^+ .

Por otro lado, Adams y Moss (1995) plantearon la hipótesis que los ácidos fenólicos, como antioxidantes pueden actuar a nivel de la membrana celular, alterando su permeabilidad, eliminando el componente de pH. Otro estudio llevado a cabo por Kwon, *et al.*, (2007) sugiere que la hidrofobicidad parcial de compuestos bifenoles, como es el caso del ácido clorogénico, les permitiría unirse a la membrana externa de las células y provocar cambios en la fluidez de la membrana; de tal manera que, una vez alterada la estructura, los compuestos fenólicos de menor tamaño podrían entrar a la célula, los compuestos antioxidantes podrían interferir indirectamente con el metabolismo secundario del hongo y por lo tanto modular la producción de micotoxinas.

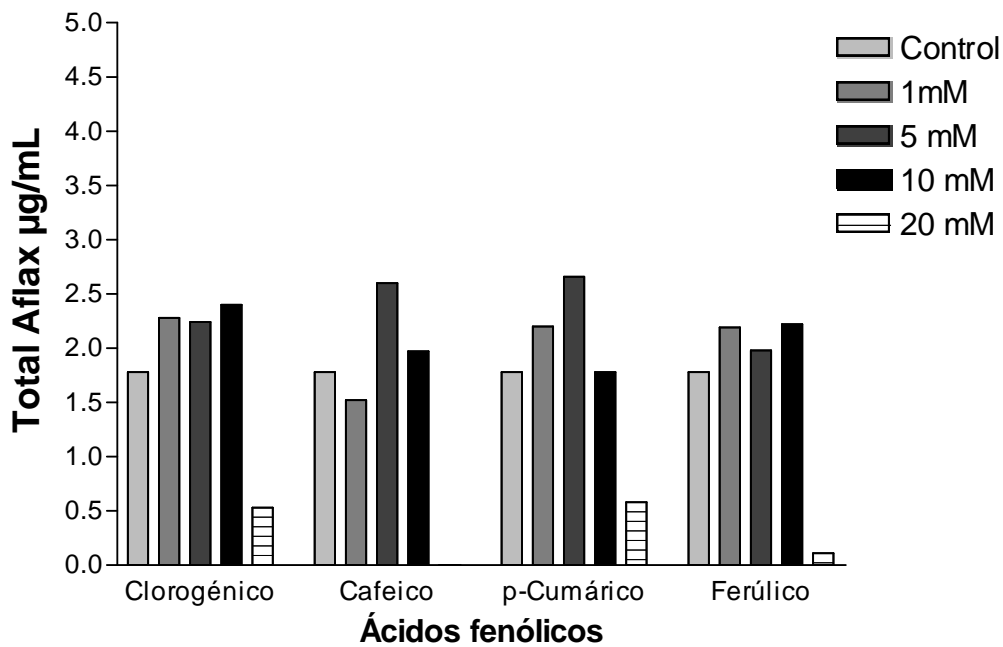
6.5.Efecto de los ácidos fenólicos sobre la biosíntesis de aflatoxinas, producidas por la cepa de *Aspergillus parasiticus* CECT 2682.

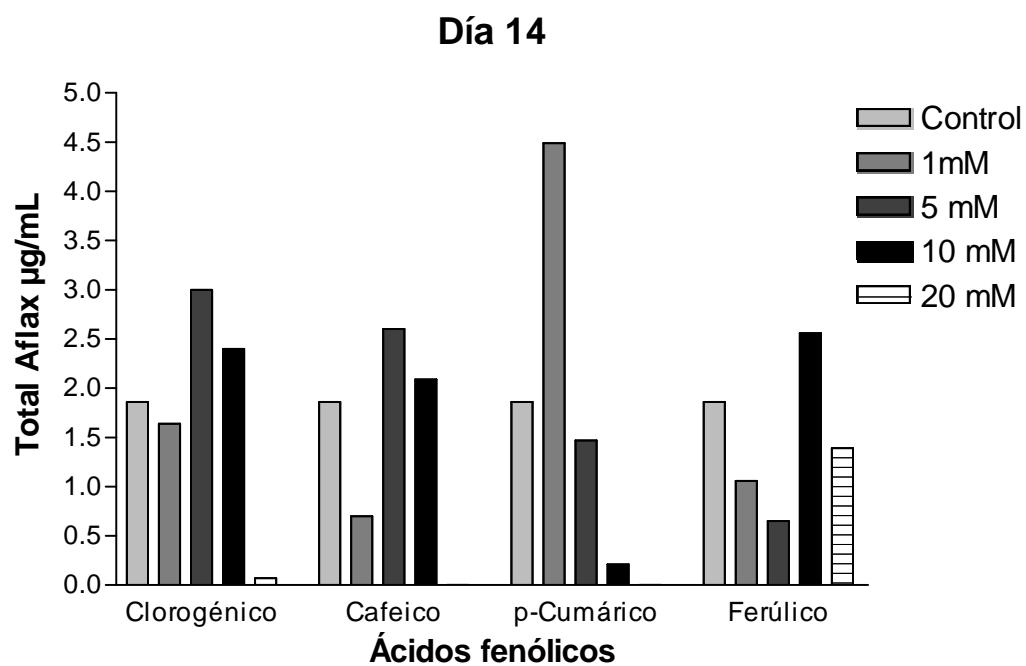
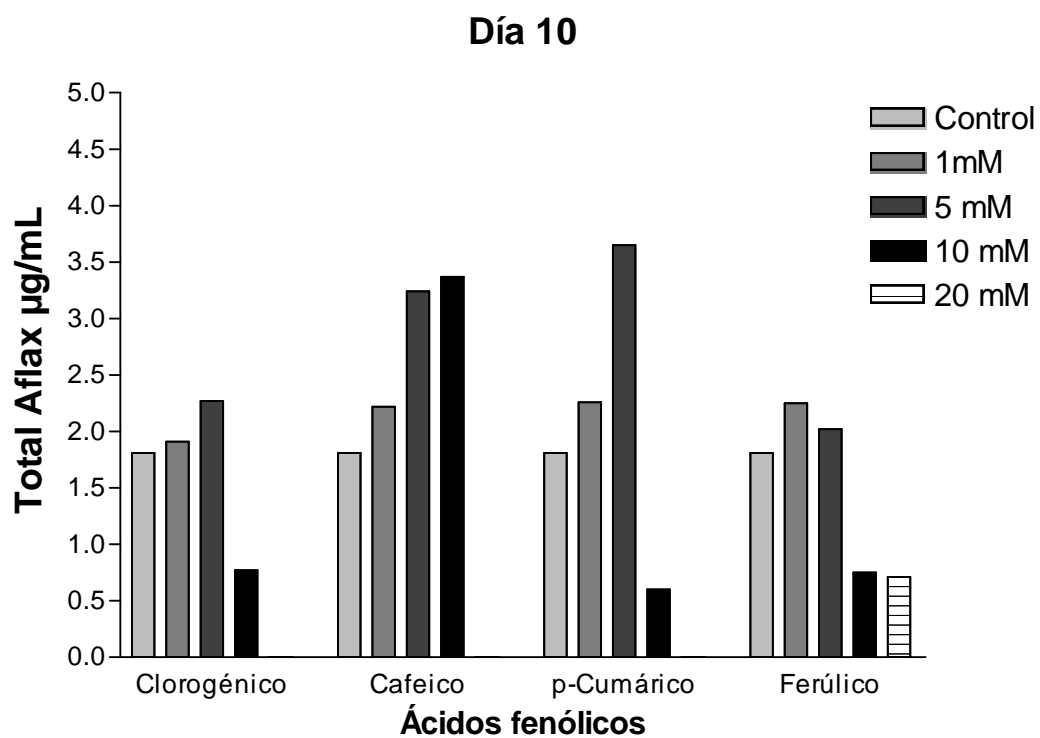
La producción de aflatoxinas se determinó mediante HPLC con el método optimizado y validado anteriormente. Los resultados se expresan como producción de aflatoxina por mL de medio de cultivo YES, así como producción de aflatoxina por gramo de micelio seco. Estos valores pueden consultarse en el Anexo 2.

Día 4



Día 7





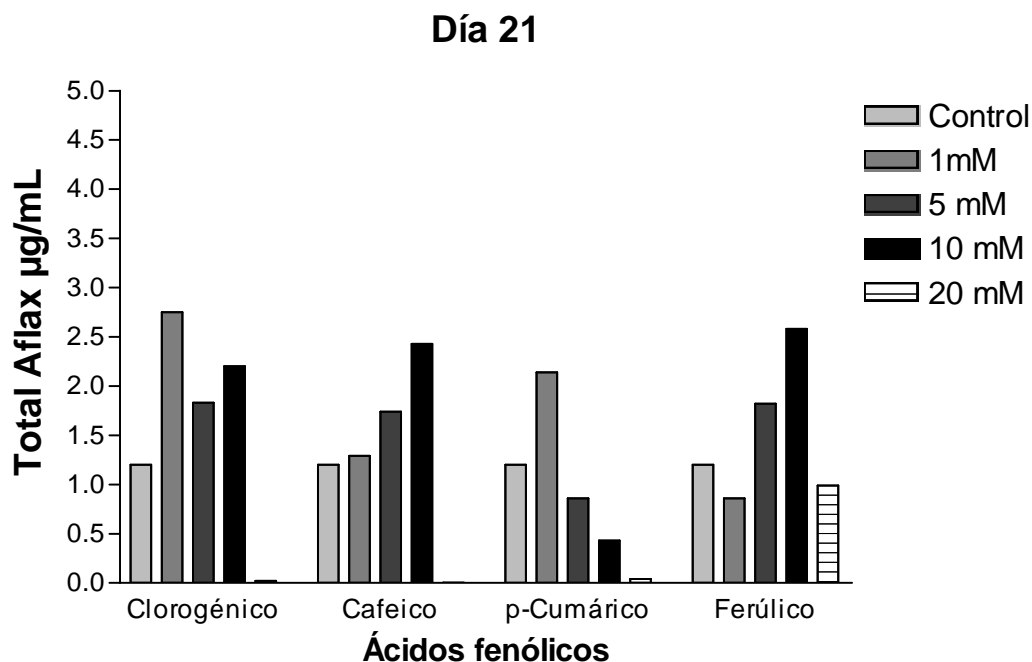


Figura 23. Producción de aflatoxinas totales (suma de $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$).

Observando las graficas, en la figura 23 podemos decir que, de manera general, cuanto mayor es la concentración de ácido fenólico, menor es la producción de aflatoxinas. A concentraciones de 20 mM, la producción de aflatoxinas se ve inhibida, a excepción del ácido ferúlico, que parece ser el menos eficaz.

Al parecer, estos compuestos actúan como factores de estrés del moho. Cuando se obstaculiza la obtención de energía debido a una disponibilidad de glucosa más baja; esto puede desencadenar la producción de metabolitos secundarios para compensar y limitar la competencia aparente por el sustrato del medio (Pagnussatt, *et al.*, 2014), sin embargo algunos autores refieren que a concentraciones bajas de ácidos fenólicos, la producción de micotoxinas, como las fumonisinas, se ve favorecida, por ejemplo, a concentraciones de 10mM de ácido ferúlico (Ferrochio, *et al.*, 2013), datos que coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo.

En las muestras no tratadas, los niveles de aflatoxinas siempre se incrementaron a lo largo del tiempo. Existen estudios a cerca del efecto del curso de tiempo en la producción de aflatoxinas (Molina y Giannuzzia, 2002) con un pico de producción máxima, seguida por un descenso próximo a cero, cinética que coincide con la producción de aflatoxinas en los controles analizados a lo largo de los 21 días de nuestro ensayo. Aunque los mecanismos exactos de degradación o de conjugación aún

no se han descrito, se supone que la degradación de las aflatoxinas se inicia por enzimas liberadas durante la lisis del micelio. Los pequeños aumentos y disminuciones en la producción de aflatoxinas a lo largo de los 21 días podrían ser el resultado de la descomposición que tienen lugar durante este tiempo (Pitt, 1993).

En el caso de otras micotoxinas, un estudio llevado a cabo por Bily (2003) informó que el ácido cafeico, ferúlico, cumárico y 3-hidroxibenzóico puede reducir la producción de tricotecenos tipo B por *F. graminearum* y que esta inhibición se produjo a concentraciones en las que el crecimiento del moho no se vio afectado; esto sugiere que la inhibición de micotoxinas no es el resultado de un efecto fungitóxico, si no que estos ácidos producen un efecto específico sobre la biosíntesis de las toxinas. De acuerdo con esta hipótesis, Boutigny (2009) sugiere que la inhibición de la síntesis de tricotecenos tipo B por el ácido ferúlico, en el género *Fusarium* podría estar regulada a nivel transcripcional (Tri genes). Los cambios en los parámetros oxidativos del medio podrían intervenir con el metabolismo secundario del moho y modular los niveles de producción de tricotecenos.

En conclusión, el presente trabajo demuestra el posible uso de los ácidos fenólicos para controlar el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*, a 25 ° C. En general, las concentraciones de ácidos fenólicos por encima de 20 mM fueron capaces de reducir el crecimiento del organismo, pero sin llegar a inhibirlo por completo, así como la producción de aflatoxinas en medio líquido. Sin embargo, las concentraciones de ácidos de 1 a 10 mM estimularon la producción de estas micotoxinas.

El ácido ferúlico, por ejemplo, es un compuesto fenólico presente de forma natural en los granos de maíz a una concentración de 3 µg/g (15.5 µM) (Adom y Liu, 2002). Esta concentración es insuficiente para controlar el deterioro y la producción de toxinas de estos mohos. Si alguno de estos ácidos fenólicos se va a utilizar durante el almacenamiento de granos como el maíz como una estrategia post-cosecha para reducir el crecimiento y la producción de micotoxinas, la concentración debería aumentarse por incorporación exógena.

8. Conclusiones.

Primera. Se realizó una puesta a punto de un método *in vitro* para evaluar la biosíntesis de aflatoxinas, basado en la inoculación de una suspensión de esporos en un medio de cultivo líquido a base de sacarosa y extracto de levadura e incubación durante 21 días a 25°C. La producción de niveles elevados de estas micotoxinas ha permitido ensayar tanto el efecto de los cuatro ácidos fenólicos (clorogénico, *p*-cumárico, cafeico y ferúlico) sobre la síntesis de aflatoxinas, como evaluar la tasa de crecimiento del moho.

Segunda. La metodología analítica optimizada y validada en este trabajo, garantiza la extracción de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, y G₂ de manera selectiva en las muestras de medio de cultivo YES obtenidas a partir del estudio *in vitro*. Además, las columnas de adsorción Mycosep® permiten una adecuada separación del analito de otras sustancias interferentes. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con derivatización fotoquímica y detector de fluorescencia permite una detección sensible y selectiva de las cuatro aflatoxinas estudiadas.

Tercera. El método validado cumple los criterios de especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión establecidos por la legislación.

Cuarta. Los ácidos fenólicos ensayados en concentraciones de 1 a 20 mM han mostrado un efecto fungistático frente a la cepa de *Aspergillus parasiticus* CECT 2682, aunque en ninguno de los casos se observó una inhibición completa del crecimiento del moho.

Quinta. La producción de aflatoxinas se vio inhibida en su totalidad a concentraciones de 20 mM. Los ácidos fenólicos que presentaron mayor efecto fueron el ácido clorogénico y cafeico. En algunos ensayos, concentraciones por debajo de 20 mM, podrían favorecer una mayor producción de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* CECT 2682.

Sexta. A falta de realizar ensayos de campo, los resultados obtenidos reflejan la dificultad de correlacionar los estudios de inhibición *in vitro* del crecimiento fúngico con los de biosíntesis de aflatoxinas debido a la complejas relaciones que existen entre los mohos y sus toxinas, las plantas, los agentes biocidas y los factores externos. Sin embargo, arrojan una idea sobre el comportamiento de estos mohos frente a estos compuestos naturales, y todavía es necesario evaluar los efectos *in vivo* de una gama más amplia de compuestos fenólicos para llegar a conclusiones definitivas acerca de su utilidad como agentes antifúngicos para proteger los sistemas de granos almacenados.

9. Bibliografía.

- Abarca, L., Bragulat, R., Cabañes, F., Calvo, A. (1986). Diagnostico de laboratorio en micología clínica. Barcelona.: Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Adom K., Liu R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182-6187.
- AESAN. (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas en alimentos. *Revista del Comité Científico* 14, 27-42.
- AOAC. (1991-1994). Official method 991.31, Aflatoxins in corn, eaw peanuts and peanuts butter. Immunoaffinity column (Aflatest) method.
- AOAC. (1994-1997). Official Method 994.08. Aflatoxins in corn, almonds, brazil nuts, peanuts and pistachios nuts. Multifunctional column (Mycosep) method.
- Ariño, A., Bullerman, L. B. (1993). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 as affected by the fungicide iprodione. *Journal of food protection*, 56, 718-721.
- Ariño, A., Herrera, M., Estopañan, G., Rota, M. C., Carramiñana, J. J. (2009). Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and effect of roasting. *Food Control*, 20, 811–814.
- Atanda, O., Akpan, I., Oluwafemi, F. (2007). The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*, 18, 601-607.
- Ayar, A., Durums, S., Con, A. H. (2007). A study on the occurrence of aflatoxin in raw milk due to feeds. *Journal of food safety*, 27, 199-207.
- Bezerra da Rocha, M. E., Chagas Oliveira Freire, F., Feitosa Maia, F. E., Florindo Guedes, M. I., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36, 159-165.
- Bily, A. C., Reid, L. M., Taylor, J. H., Johnston, D., Malouin C., Burt, A. (2003). Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 93, 712–719.
- Boutigny A.; Barreau, C.; Atanasova, V.; Verdal, M.; Pinson-Gadais, L. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research*, 113, 746–753.
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Celano, R., Rastrelli, L. (2011). Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereal products. *Journal of Chromatography*, 1218, 7648– 7654.
- Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A. (2013). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 51, 188–193.
- Cotty, P. J., Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 109–115.

- Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 (2002/657/CE), por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados. DOUE L:221, 8-36
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Effects on public health of an increase of the levels for aflatoxin total from 4 µg/kg to 10 µg/kg for tree nuts other than almonds, hazelnuts and pistachios - Statement of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. The EFSA Journal.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013). Aflatoxins (sum of B1, B2, G1 , G2) in cereals and cereals-derived food products. Parma, Italy. The EFSA Journal.
- Ferreira, V. (1997). Cromatografía fundamentos y práctica. Zaragoza: Servicio de Publicaciones Universidad de Zaragoza.
- Ferrochio, L., Cendoya, E., Farnochi, M. C., Massad, W., Ramirez, M. L. (2013). Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 215–220.
- Gandomi, H., Misaghi, A., Akhondzadeh Basti, A., Bokaei, S., Khosravi, A. (2009). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2397–2400.
- Golge, O., Hepsag, F., Kabak, B. (2013). Incidence and level of aflatoxin contamination in chilli commercialised in Turkey. *Food Control*, 33, 514-520.
- Hariprasad, P., Durivadivel, P., Snigdha, M., Venkateswaran, G. (2013). Natural occurrence of aflatoxin in green leafy vegetables. *Food Chemistry*, 138, 1908–1913.
- IARC. (2012). A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations. *International Agency for Research on Cancer* 100, 225-248.
- Jager, A., Tedesco, M., Souto, P., Oliveira, C. (2013). Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 33, 87-92.
- Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N., Groopman, J. D. (2011). Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological Sciences*, 120, 28-48.
- Klich, M. A. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 71-80.
- Kwon, Y., Apostolidis, E., Labbe, R., Shetty, K. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by phenolic phytochemicals of selected clonal herbs species of Lamiaceae family and likely mode of action through proline oxidation. *Food Biotechnology*, 21, 71–89.
- Lacombe, A., Wu, V., Tyler, S., Edwards, K. (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* , 139, 102–107.

- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Luber, G., Kieszak, S. (2005). Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1763-1767.
- Liu, L., Shewry, P. R., Ward, J. L. (2008). Phenolic Acids in Wheat Varieties in the Healthgrain Diversity Screen. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 9732–9739.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46, 207–219.
- Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vah, N., Darja, S. (2013). Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, 312-317.
- Molina, M., Giannuzzia, L. (2002). Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International*, 35, 585–594.
- Nesci, A., Gsponer, N., Etcheverry, M. (2007). Natural Maize Phenolic Acids for Control of Aflatoxigenic Fungi on Maize. *Food Microbiology and Safety*, 72, 180-185.
- Pagnussatt, F. A., Medeiros, E., Garda-Bufferon, J. (2014). Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 108, 21–26.
- Palumbo, J. D., O’Keeffe, T. L. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164, 241-241.
- Passone, M. S., Etcheverry, M. (2005). In vitro effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B1 accumulation by peanut *Aspergillus section Flavi*. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 682–691.
- Pitt, R. (1993). A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. *J. Food Protect.*, 56, 139–146.
- Pizzutti, I. R., Kok, A., Scholtenb, J., Righi, W., Cardoso, C. (2014). Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 129, 352–363.
- Rasch, C., Böttcher, M., Kumke, M. (2010). Determination of aflatoxin B1 in alcoholic beverages: comparison of one- and two-photon-induced fluorescence. *Anal Bioanal Chem* (2010), 397, 87-92.
- Razzaghi-Abyaneha, M., Shams-Ghahfarokhib, M., Yoshinaric, T., Rezaeed, M.-B., Hiromichi Nagasawac, K. J., Sakudac, S. (2008). Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 228–233.
- Reglamento (CE) N° 401/2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial de contenidos de micotoxinas en los productos alimenticios. *DOUE L*:70, 12-34.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3–10.

- Russell, R., Paterson, M., Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43, 1902–1914.
- Russell, R., Paterson, M., Lima, N., Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, 61, 1–15.
- Saleemullah, A. I., Iqtidar, K., A., Hamidullah, S. (2006). Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food Chemistry*, 98, 699–703.
- Samapundo, S., De Meulenaerb, B., Osei-Nimoha, D., & Lambonia, Y. (2007). Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology*, 24, 465–473.
- Sanchis, V., Magan, N., Olsen, M. (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. *Mycotoxins in food: detection and control*, 174-189.
- Sindhu, S., Chempakam, B., Leela, V., Suseela Bhai, R. (2011). Chemoprevention by essential oil of turmeric leaves (*Curcuma longa* L.) on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1188–1192.
- Sobolev, V. S., Dorner, J. W. (2002). Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural commodities by liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*, 85, 642–645.
- Sook, H., Kim, H., Ok, H., Hwang, J., Chung, D. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102, 385-391.
- Soriano, J. M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- UNE-EN ISO, 1650:2011. Determinación de aflatoxina B1, y contenido total de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 en cereales, nueces, y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución.
- Zabka, M., Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*, 93, 1051–1056.
- Zinedine, A., Mañes, J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control*, 20, 334–344.
- Zinedine, A., González-Osnaya, L., Soriano, J. (2007). Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiology*(114), 25-29.

Anexo 1. Efecto de los ácidos fenólicos (mM) sobre el peso seco del micelio (gr) en *Aspergillus parasiticus* CECT 2682 a 25 °C.

Ácido fenólico		Nivel de ácido fenólico en caldo de cultivo YES (mM)				
	Día	Control	1	5	10	20
Clorogénico	4	0,2562	0,2596	0,3245	0,2583	0,2298
	7	0,2670	0,1542	0,1743	0,1545	0,1275
	10	0,3961	0,0695	0,0743	0,1156	0,0925
	14	0,5117	0,0600	0,0972	0,1258	0,0927
	21	0,6870	0,1268	0,1461	0,1530	0,1341
Cafeico	4	0,2562	0,2931	0,2841	0,3124	0,2533
	7	0,2670	0,1801	0,2064	0,1866	0,1406
	10	0,3961	0,0714	0,0771	0,0928	0,0823
	14	0,5117	0,0864	0,0758	0,1332	0,0672
	21	0,6870	0,1029	0,1173	0,1294	0,0835
p-Cumárico	4	0,2562	0,2429	0,3217	0,3300	0,2792
	7	0,2670	0,1825	0,1619	0,1634	0,1450
	10	0,3961	0,0768	0,0774	0,0923	0,0700
	14	0,5117	0,0812	0,0864	0,0873	0,1269
	21	0,6870	0,0566	0,0967	0,1000	0,0868
Ferúlico	4	0,2562	0,2737	0,3296	0,4058	0,2639
	7	0,2670	0,1322	0,1851	0,1489	0,1282
	10	0,3961	0,0604	0,0627	0,0580	0,0487
	14	0,5117	0,1098	0,0997	0,0906	0,0911
	21	0,6870	0,0873	0,0612	0,0733	0,0258

Anexo 2. Efecto de los ácidos fenólicos (mM) sobre la producción total de aflatoxinas(calculada como $B_1+B_2+G_1+G_2$ µg/mL YES) en *Aspergillus parasiticus* CECT 2682 a 25 °C.

Día	Acido	Ac. fenólico (Mm)	G ₂ µg/mL de YES	G ₁ µg/mL de YES	B ₂ µg/mL de YES	B ₁ µg/mL de YES	Total AF µg/mL de YES	Total AF µg/gr micelio seco.
4	Clorogénico	control	1,02	1,72	0,11	0,46	1,31	51,00
		1	0,85	1,46	0,11	0,47	2,89	111,39
		5	0,78	1,35	0,14	0,73	2,99	92,14
		10	0,30	0,60	0,15	0,99	2,04	78,98
		20	--*	--	--	--	--	--
	Cafeico	1	0,42	2,37	0,06	0,19	3,05	103,95
		5	0,57	1,03	0,08	0,32	2,00	70,27
		10	0,47	0,87	0,10	0,69	2,13	68,24
		20	--	--	--	--	--	--
	p-Cumárico	1	0,74	1,30	0,10	0,38	2,53	103,99
		5	0,38	1,03	0,06	0,23	1,71	53,01
		10	0,06	0,54	0,03	0,03	0,65	19,74
		20	--	0,11	--	0,03	0,13	4,74
	Ferúlico	1	0,26	1,49	0,05	0,14	1,95	71,10
		5	0,42	2,11	0,06	0,18	2,78	84,31
		10	0,16	0,98	0,04	0,10	1,27	31,41
		20	0,13	0,61	0,01	0,05	0,80	30,28
7	Clorogénico	control	0,50	0,92	0,09	0,27	1,78	66,82
		1	0,67	1,18	0,10	0,32	2,28	147,94
		5	0,53	0,96	0,14	0,61	2,24	128,23
		10	0,17	1,51	0,09	0,63	2,40	155,23
		20	0,02	0,23	0,03	0,25	0,53	41,66
	Cafeico	1	0,23	1,11	0,04	0,14	1,52	84,16
		5	0,66	1,16	0,16	0,61	2,60	125,91
		10	0,21	1,44	0,06	0,25	1,97	105,40
		20	--	--	--	--	--	--

10	<i>p</i>-Cumárico	1	0,31	1,64	0,06	0,20	2,20	120,70
		5	0,31	1,96	0,09	0,31	2,66	164,25
		10	0,25	1,34	0,05	0,14	1,78	109,03
		20	0,06	0,37	0,02	0,13	0,58	40,19
	Ferúlico	1	0,61	1,09	0,10	0,38	2,19	165,61
		5	0,25	1,52	0,05	0,16	1,98	106,93
		10	0,30	1,61	0,08	0,24	2,22	149,40
		20	0,02	0,05	0,02	0,03	0,11	8,95
	Clorogénico	control	0,52	0,94	0,09	0,26	1,81	45,60
		1	0,54	0,97	0,10	0,30	1,91	274,94
		5	0,54	0,97	0,15	0,61	2,27	305,95
		10	0,21	0,46	0,11	0,02	0,80	69,20
		20	--	--	--	--	--	--
	Cafeico	1	0,62	1,10	0,13	0,38	2,22	311,57
		5	0,52	2,22	0,13	0,36	3,24	420,01
		10	0,53	2,23	0,12	0,49	3,37	362,74
		20	--	--	--	--	--	--
	<i>p</i>-Cumárico	1	0,36	1,59	0,08	0,23	2,26	294,20
		5	0,56	2,38	0,15	0,56	3,65	471,95
		10	0,05	0,40	0,02	0,12	0,60	64,52
		20	--	--	--	--	--	--
	Ferúlico	1	0,37	1,60	0,07	0,20	2,25	371,82
		5	0,35	1,45	0,06	0,16	2,02	322,79
		10	0,45	0,00	0,07	0,22	0,75	128,80
		20	0,11	0,52	0,02	0,06	0,71	146,36
14	Clorogénico	control	0,32	1,34	0,06	0,14	1,86	36,40
		1	0,23	1,17	0,07	0,17	1,64	272,60
		5	0,32	1,95	0,09	0,32	2,68	275,72
		10	0,42	1,80	0,19	0,03	2,44	193,96
		20	--	--	--	0,07	0,07	7,02
	Cafeico	1	0,13	0,46	0,03	0,08	0,70	81,43
		5	0,40	1,75	0,11	0,34	2,60	343,13
		10	0,21	1,48	0,07	0,32	2,09	156,65
		20	--	--	--	--	--	--

21	<i>p</i>-Cumárico	1	0,78	3,23	0,11	0,37	4,49	553,17
		5	0,22	1,09	0,04	0,13	1,47	169,99
		10	0,01	0,11	0,01	0,08	0,21	24,51
		20	--	--	--	--	--	--
	Ferúlico	1	0,16	0,78	0,03	0,08	1,06	96,20
		5	0,11	0,47	0,02	0,05	0,65	65,38
		10	0,43	1,84	0,07	0,22	2,56	282,87
		20	0,23	1,03	0,03	0,09	1,39	152,31
	Clorogénico	control	0,19	0,87	0,04	0,11	1,20	17,52
		1	0,42	1,94	0,10	0,29	2,75	214,00
		5	0,19	0,90	0,14	0,59	1,83	124,96
		10	0,19	1,44	0,10	0,46	2,20	143,67
		20	--	--	0,01	0,07	0,02	1,23
	Cafeico	1	0,21	0,89	0,06	0,13	1,29	125,75
		5	0,27	1,18	0,09	0,21	1,74	148,57
		10	0,35	1,54	0,11	0,44	2,43	188,11
		20	--	--	--	--	--	--
	<i>p</i>-Cumárico	1	0,35	1,52	0,07	0,20	2,14	377,35
		5	0,11	0,54	0,06	0,16	0,86	89,01
		10	0,03	0,26	0,02	0,11	0,43	43,18
		20	--	--	0,01	0,04	0,04	5,01
	Ferúlico	1	0,12	0,62	0,03	0,09	0,86	98,55
		5	0,31	1,20	0,09	0,21	1,82	298,17
		10	0,41	1,78	0,09	0,29	2,58	351,54
		20	0,18	0,63	0,06	0,12	0,99	385,26

* Por debajo del límite de detección